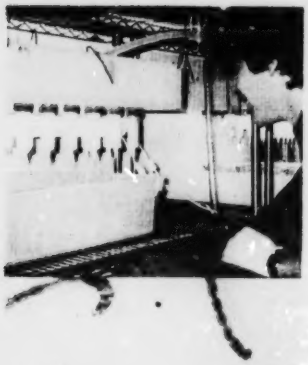
SPE 1/RM/32 - Décembre 1997
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada



SÉRIE DE LA
PROTECTION DE
L'ENVIRONNEMENT

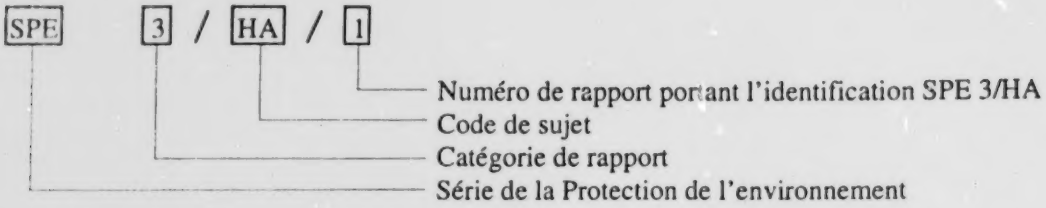
Méthode d'essai biologique: essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments

Environnement Canada Environment Canada

Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

Sujets

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Printed on recycled paper

Imprimé sur du papier recyclé

102-04809/

Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/32
Décembre 1997

Données de catalogage avant publication (Canada)

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique. Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments

(Rapport ; SPE 1/RM/32
Publ. aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Test for survival and growth in sediment using larvae of freshwater midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*)
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-660-95569-5
N° de cat. En49-24/1-32F

1. Diptères -- Toxicologie -- Canada.
2. Chironomes -- Toxicologie -- Canada.
3. Sédiments des estuaires -- Toxicologie -- Canada.
4. Environnement -- Surveillance -- Canada.
5. Toxicité -- Tests -- Méthodologie -- Canada.
I. Centre de technologie environnementale (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes.
II. Canada. Environnement Canada.
III. Coll. : Rapport d'information (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/32.

QL531.B54 1998 595.772 C98-980157-8

© Ministre de Travaux publics et Services gouvernementaux 1997

Commentaires

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
3439, River Road South
Gloucester (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English from:

Environmental Protection Publications
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation de l'emploi de ces produits par Environnement Canada.

Résumé

*Le présent rapport décrit les méthodes que recommande Environnement Canada pour les essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de larves de chironomes (*Chironomus tentans *ou* C. riparius*). Les paramètres de mesure sont la survie et le poids des larves au bout des 10 journées de l'essai.*

L'essai se déroule dans des bechers ou des jarres de verre de 300 mL renfermant 100 mL de sédiment recouvert de 175 mL d'eau et maintenus à 23 ± 1 °C. Il faut normalement cinq de ces récipients au moins, renfermant chacun 10 C. tentans *ou 10* C. riparius*, par variante de l'expérience. L'essai peut porter sur une seule concentration (p. ex. des échantillons non dilués de sédiment prélevés sur le terrain) ou sur une gamme de concentrations (p. ex. sédiment enrichi de différentes concentrations de mélanges de produits chimiques et de sédiment) afin de déterminer le seuil à partir duquel se manifeste l'effet. Au début de l'essai, on utilise des larves du troisième stade de* C. tentans *ou du premier stade de* C. riparius.

Durant l'essai, on peut renouveler ou non l'eau surnageante. Dans le premier cas, on doit la renouveler deux fois par jour dans chaque récipient, et, normalement, il n'y a pas d'aération. En conditions statiques (sans renouvellement) cependant, on aère l'eau. Quelle que soit l'option retenue, on nourrit les larves de flocons moulus de nourriture pour poissons tropicaux, soit journellement, à raison de 6,0 mg de matières solides par repas, soit quatre fois seulement (au cours de journées non consécutives) au moyen de 15,0 mg de matières solides par repas. Le choix du régime dépend de l'objectif de l'étude et peut-être aussi des lignes directrices ou des exigences réglementaires.

Le rapport expose les conditions et le mode opératoire généraux ou universels de la préparation de l'essai et de son exécution. S'y ajoutent des conditions et des modes opératoires propres à la finalité prévue de l'essai. Ce dernier permet de mesurer et d'évaluer la toxicité d'échantillons de sédiment de boue ou de matière particulaire semblable, prélevés sur le terrain, ou de sédiment enrichi (additionné) au laboratoire de substances ou de produits chimiques, de sédiment contaminé ou d'autres matières particulaires. Le rapport renferme aussi des instructions et des exigences sur les installations servant à la réalisation des essais, sur le prélèvement des échantillons, leur manutention et leur entreposage, sur l'élevage des organismes d'essai, sur la préparation du sédiment ou des mélanges de sédiment et d'autres matières ainsi que sur la mise en branle des essais, les conditions expérimentales précises, les observations et les mesures convenables à faire, les paramètres de mesure et les méthodes de calcul de même que l'emploi de toxiques de référence.

Abstract

*Methods recommended by Environment Canada for performing sediment toxicity tests using midge larvae (*Chironomus tentans *or* C. riparius*) are described in this report. The endpoints for the test are survival and weight of chironomid larvae at the end of a 10-day assay.*

This 10-day sediment toxicity test is conducted at 23 ± 1 °C in 300-mL glass beakers or jars containing a 100-mL layer of sediment and 175 mL of overlying water. A minimum of five test chambers, each containing 10 C. tentans *or 10* C. riparius*, are normally used to replicate each treatment. The test may be run as a single-concentration assay (e.g., using undiluted samples of field-collected sediment), or as a multi-concentration assay (e.g., a spiked sediment test with chemical/sediment mixtures) to determine the threshold of effect. Third instar* C. tentans*, or first instar* C. riparius*, are used to start the test.*

The test may be performed either as an intermittent-renewal assay, or as a static (i.e., no renewal) toxicity test. If the renewal option is chosen, twice daily renewal of the overlying water in each test chamber is required, and the overlying water is normally not aerated. If the static option is chosen, the overlying water is aerated. Using either test option, the larvae are fed ground tropical fish food flakes, either as a daily ration of 6.0 mg dry solids per feed or four times only (nonconsecutive days) with 15.0 mg dry solids per feed. Selection of either option depends on the objectives of the study and perhaps also on regulatory guidelines or requirements.

General or universal conditions and procedures are outlined for test preparation and performance. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific to the intended use of the test. This test is suitable for measuring and assessing the toxicity of samples of field-collected sediment, sludge, or similar particulate material, or of sediment spiked (mixed) in the laboratory with chemical(s) or chemical substance(s), contaminated sediment, or other particulate material. Instructions and requirements are included on test facilities, sample collection, handling and storing samples, culturing test organisms, preparing sediment or spiked-sediment mixtures and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de ***méthodes recommandées*** *pour mesurer et évaluer les effets des substances ou des matières toxiques en milieu aquatique. Ces méthodes ont été évaluées par Environnement Canada et elles sont recommandées pour les applications suivantes :*

- *mesures de la toxicité en milieu aquatique dans les laboratoires d'Environnement Canada ;*
- *essais impartis par Environnement Canada ou demandés par des organismes ou des entreprises de l'extérieur ;*
- *mesures pour lesquelles on ne dispose pas d'instructions plus précises, comme dans les règlements ;*
- *comme base d'instructions très explicites, comme pourrait en exiger un protocole réglementaire ou une méthode normalisée de référence.*

On a retenu les différents types d'essais compris dans cette série parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en œuvre par Environnement Canada. Les documents de la collection visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour la collecte de données sur les effets toxiques — pour la vie aquatique — de certaines substances ou matières destinées à se retrouver dans le milieu aquatique ou s'y trouvant déjà. Selon la méthode choisie de dosage biologique, les substances ou les matières dont on veut mesurer la toxicité pourrait comprendre des échantillons de substances ou de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats, d'eaux réceptrices ou, s'il y a lieu, de sédiments ou de matières particulaires semblables.

Table des matières

Résumé iv
Abstract v
Avant-propos vi
Liste des tableaux x
Liste des figures x
Liste des abréviations et des formules chimiques xi
Terminologie xiii
Remerciements xxi

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 Identification, répartition, cycle biologique 6
1.3 Emploi antérieur dans les essais toxicologiques 7
1.4 Tolérance et sensibilité relative en laboratoire 9

Section 2
Organismes d'essai 13
2.1 Espèces et stade 13
2.2 Origine et acclimatation 13
2.3 Élevage 14
2.3.1 Généralités 14
2.3.2 Installations et appareillage 15
2.3.5 Température 19
2.3.6 Oxygène dissous 19
2.3.7 Substrat 19
2.3.8 Alimentation 20
2.3.9 Manipulation des organismes 20
2.3.10 Établissement et entretien des élevages 20
2.3.11 Critères de santé 21

Section 3
Système expérimental 23
3.1 Installations et appareillage 23
3.2 Éclairage 25
3.3 Enceintes expérimentales 25
3.4 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution 25
3.5 Sédiment témoin 26

Section 4
Modes opératoires universels 27
4.1 Début de l'essai 30
4.2 Conditions expérimentales 33
4.3 Oxygène dissous et aération 36
4.4 Nourriture et alimentation 36
4.5 Observations et mesures au cours de l'essai 38
4.6 Fin de l'essai 39
4.7 Paramètres de mesure et calculs 41
4.8 Essais avec toxique(s) de référence 42

Section 5
Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sédiment (ou de matières particulaires semblables) prélevé sur le terrain . . . 47
5.1 Prélèvement de l'échantillon 47
5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse de l'échantillon 49
5.3 Préparation de l'échantillon en vue des essais 51
5.4 Eau d'essai 53
5.5 Observations et mesures au cours de l'essai 53
5.6 Paramètres de mesure et calculs 54
5.6.1 Variations dans le plan d'expérience et dans les analyses 55
5.6.2 Analyse de la puissance 57

Section 6
Modes opératoires particuliers pour les essais employant des sédiments enrichis 59
6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon 59
6.2 Préparation des mélanges destinés aux essais 60
6.3 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution 64
6.4 Observations et mesures expérimentales 64
6.5 Paramètres de mesure et calculs 64
6.5.1 Concentration létale médiane (CL50) 65
6.5.2 Concentration inhibitrice (CIp) 68
6.5.3 Test d'hypothèse (CSEO et CEMO) 69

Section 7
Rapports à produire 72
7.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai 73
7.1.1 Substance ou matière d'essai 73
7.1.2 Organismes utilisés 73
7.1.3 Installations expérimentales 73
7.1.4 Eau d'essai 73
7.1.5 Méthode expérimentale 73
7.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires 73

7.1.7 Résultats 74
7.2 Exigences supplémentaires 74
7.2.1 Substance ou matière d'essai 75
7.2.2 Organismes d'essai 75
7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux 75
7.2.4 Sédiment témoin et eau d'essai 75
7.2.5 Méthode expérimentale 76
7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires 76
7.2.7 Résultats de l'essai 76

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (juillet 1997) 92

Annexe B
Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada 94

Annexe C
Variantes des méthodes d'élevage des chironomes, décrites dans les méthodes canadiennes, américaines et européennes 95

Annexe D
Variantes du mode opératoire des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de chironomes, décrites dans les méthodes canadiennes, américaines et européennes 103

Annexe E
Variantes du mode opératoire des essais toxicologiques de référence à l'aide de chironomes, décrites dans les méthodes canadiennes, américaines et européennes 116

Annexe F
Systématique générale de *Chironomus tentans* (Fabricius, 1805) 122

Annexe G
Systématique générale de *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) 129

Annexe H
Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques 133

Liste des tableaux

1. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage des larves de chironomes destinés aux essais de mesure de la toxicité des sédiments 16
2. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour la mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de chironomes 27
3. — Âge et largeur de la capsule céphalique de larves de *Chironomus tentans* et de *Chironomus riparius* élevées à 23 °C 34
4. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais toxicologiques de référence *dans l'eau seulement* employant des chironomes 43

Liste des figures

1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais toxicologiques avec des chironomes et divers types de substances et de matières 5
2. — Estimation de la concentration létale médiane, par établissement du graphique des taux de mortalité sur papier log-probabilité 67

Liste des abréviations et des formules chimiques

<	plus petit que
>	plus grand que
%	pour cent
µg	microgramme
µm	micromètre
µS	microsiemens
σ	écart-type
ANOVA	analyse de la variance
$CaCl_2$	chlorure de calcium
$CaCO_3$	carbonate de calcium
$CaSO_4$	sulfate de calcium
$CdCl_2$	chlorure de cadmium
CE50	concentration efficace médiane
CEMO	concentration avec effet minimal observé
CESO	concentration avec effet de seuil observé
CIp	concentration inhibitrice (p étant le taux précisé d'effet)
CL50	concentration létale médiane
cm	centimètre
CSEO	concentration sans effet observé
$CuSO_4$	sulfate de cuivre
CV	coefficient de variation
ESM	écart significatif minimal
g	gramme
h	heure
j	jour
KCl	chlorure de potassium
kg	kilogramme
L	litre
LCT	levure, Cerophyll^{MC} et aliment pour truite
mg	milligramme
$MgSO_4$	sulfate de magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mS	millisiemens
NaCl	chlorure de sodium
$NaHCO_3$	bicarbonate de sodium
O_2	oxygène
OD	oxygène dissous
s	seconde

v/v	en volume, volume/volume
≤	plus petit que ou égale à
±	plus ou moins
≥	plus grand que ou égale à
MC	marque de commerce
‰	partie par millier ; pour mille ; millième
°C	degré Celsius

Terminologie

Nota : toutes les définitions s'inscrivent dans le contexte du présent rapport ; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* exprime une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait (devraient)* et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*), etc. expriment une recommandation ou la nécessité de respecter dans la mesure du possible la condition ou la méthode.

L'auxiliaire *peut (peuvent)* autorise une action.

L'auxiliaire *pourrait (pourraient)* indique la possibilité ou l'éventualité.

Termes techniques généraux

à renouvellement continu, se dit d'un appareillage ou d'essais dans lesquels on renouvelle continuellement la solution ou l'eau surnageante du milieu expérimental par l'apport constant d'une solution fraîche.

à renouvellement périodique, syn. de À RENOUVELLEMENT INTERMITTENT.

à renouvellement intermittent, se dit d'un appareillage (y compris les enceintes expérimentales) ou d'essais dans lesquels on renouvelle périodiquement la solution ou l'eau surnageante, habituellement au début de chaque période de 12 ou de 24 h. Syn. À RENOUVELLEMENT PÉRIODIQUE.

acclimatation, adaptation physiologique à une valeur précise d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple à la température. S'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

conductivité, grandeur physique caractérisant la capacité de conduction du courant électrique par une solution aqueuse. Elle dépend de la concentration des ions en solution, de leur valence, de leur mobilité et de la température de la solution. L'unité est le microhm^{-1} · centimètre^{-1} ($\mu\Omega^{-1} \cdot cm^{-1}$) ou le millisiemens/mètre ($mS \cdot m^{-1}$).

conformité, respect des exigences officielles en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

en conditions statiques, se dit d'un essai toxicologique au cours duquel on ne renouvelle pas les solutions ni l'eau surnageante.

lux, unité d'éclairement, c'est-à-dire l'intensité lumineuse par mètre carré. Le lux = 0,0929 pied-bougie ; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

pH, logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Le pH exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines sur une échelle de 0 à 14, où le pH 7 représente la neutralité. Les pH inférieurs à 7 correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes, alors que les pH supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

photopériode, durée quotidienne de la période d'éclairement.

pourcentage (%), concentration exprimée en nombre de parties sur cent. 10 % d'une substance représentent 10 unités ou parties de la substance diluées dans un sédiment ou dans l'eau jusqu'à concurrence de 100 parties en tout. Selon la substance, la concentration s'exprime en pourcentage en masse de la substance sur la masse du mélange final de sédiment ou de solution finale, en pourcentage en masse sur le volume ou, encore, en pourcentage en volume sur le volume.

prétraitement, traitement d'un échantillon de sédiment ou d'une portion de cet échantillon, avant que les organismes d'essai n'y soient exposés.

ratio antennaire, rapport de la somme de la longueur du segment distal long du flagelle et de la longueur du segment apical (s'il existe) à la longueur totale des segments basaux courts du flagelle. On ne le mesure que chez le mâle adulte du chironome.

ratio basitarso-tibial, rapport de la longueur du premier article tarsal (c'est-à-dire du basitarse) à la longueur du tibia de la patte antérieure du chironome adulte, mâle ou femelle.

surveillance, vérification courante (p. ex. quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle), de la qualité, de la collecte et de la communication de données. Dans le présent rapport, s'applique à certaines variables biologiques ou variables relatives à la qualité de l'eau ou au prélèvement et à la mesure de la toxicité d'échantillons de sédiments.

Terminologie des substances ou matières d'essai

eau déchlorée, eau chlorée à l'origine (généralement eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.

eau de porosité (également dite *eau interstitielle*), eau occupant les interstices entre les particules de sédiment.

eau désionisée, eau qu'on a débarrassée des ions Ca^{++} et Mg^{++} par passage dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

eau d'essai, eau recouvrant la couche de sédiment dans les enceintes expérimentales, c'est-à-dire l'*eau surnageante*. Désigne également l'eau servant à manipuler le sédiment, au besoin (p. ex. pour la préparation d'un sédiment artificiel ou de mélanges de sédiments enrichis ou pour le tamisage hydraulique), ou l'eau servant de témoin ou à la dilution, dans les essais « *n'utilisant que de l'eau* » avec des toxiques de référence.

eau distillée, eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (de verre borosilicaté ou d'un autre matériau) pour en éliminer les impuretés.

eau reconstituée, eau désionisée ou distillée dans le verre, de grande pureté, à laquelle on a ajouté des composés chimiques de qualité « réactif ». L'eau douce ainsi obtenue devrait être exempte de contaminants et posséder le pH, l'alcalinité et la dureté recherchés.

eau surnageante, eau recouvrant le sédiment de l'enceinte expérimentale.

eau témoin ou de dilution, eau servant à la préparation d'une série de solutions filles d'un produit chimique d'essai ou eau servant de surnageant dans un essai toxicologique appliqué au sédiment ou servant d'eau témoin dans un essai *utilisant de l'eau seulement* et un toxique de référence. C'est souvent l'eau dans laquelle on élève les organismes ou l'eau (surnageante) d'essai.

essai toxicologique de référence, essai utilisant, pour la mesure de la toxicité d'un sédiment, un toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment où on évalue la substance ou de la matière d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce produit chimique. Si les résultats s'écartent d'un intervalle normal établi, cela signifie que la sensibilité des organismes ainsi que la performance et la précision de l'essai sont douteuses. Le plus souvent, cet essai est effectué en l'absence de sédiment (essai *n'employant que de l'eau*), bien que l'on puisse, en l'occurrence utiliser un sédiment enrichi.

produit chimique, tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourraient se retrouver associés à des sédiments ou à de l'eau ou y être mélangés ou ajoutés.

sédiment, matériau naturel formé de particules ayant été transportées dans l'eau puis déposées au fond. Peut également désigner un substrat artificiel, constitué de matières particulaires

choisies (p. ex. du sable d'une granulométrie donnée, de la bentonite [argile], etc.) dans lequel les organismes soumis à l'expérience peuvent fouir.

sédiment contaminé, sédiment renfermant des concentrations de substances chimique qui posent une menace réelle ou potentielle pour l'environnement ou la santé humaine.

sédiment d'essai, échantillon de sédiment complet, prélevé sur le terrain, dans un endroit que l'on croit contaminé par un ou plusieurs produits chimiques, et que l'on se propose d'utiliser dans des essais toxicologiques. Ce peut parfois être un échantillon de sédiment ou un mélange de sédiments enrichis (y compris un sédiment témoin et un sédiment de référence) utilisé dans l'essai.

sédiment de référence, échantillon, prélevé sur le terrain, d'un sédiment que l'on pense n'être pas contaminé, choisi pour ses propriétés (p. ex. granulométrie, densité et teneur en matières organiques totales), qui correspondent étroitement à celles du ou des échantillons du sédiment d'essai, sauf pour ce qui concerne la teneur en contaminants chimiques. On le prélève souvent dans un endroit à l'abri des sources de contamination, mais généralement à proximité des endroits où on prélève le sédiment d'essai.

sédiment dopé, voir SÉDIMENT ENRICHI.

sédiment enrichi, sédiment (contaminé ou non) auquel, pour les besoins de l'expérience, on a ajouté une substance ou une matière d'essai, par exemple un produit chimique, un mélange de produits chimiques, de la boue (y compris des boues de forage), des déblais contaminés ou du sédiment contaminé, après quoi on a mélangé le tout à fond afin de l'homogénéiser dans tout le sédiment. Syn. SÉDIMENT DOPÉ.

sédiment entier, sédiment intact, auquel on expose les organismes d'essai. Ce n'est ni une forme ni un dérivé du sédiment tel que l'eau de porosité ni un sédiment remis en suspension.

sédiment non contaminé, sédiment qui ne contient pas de concentrations de substance(s) pouvant causer des désordres observables chez les organismes d'essai, abréger leur survie ou ralentir leur croissance durant l'essai.

sédiment témoin, sédiment non contaminé par des concentrations d'un ou de plusieurs contaminants qui pourraient influer sur la survie, la croissance ou le comportement des organismes d'essai. Ce pourrait être un sédiment naturel provenant d'un endroit non contaminé ou un sédiment reconstitué. Il ne doit être additionné d'aucune matière ou substance d'essai et il doit permettre une survie acceptable (c'est-à-dire d'au moins 70 %) des organismes d'essai. Grâce à lui, on peut interpréter les résultats des essais toxicologiques portant sur un ou des sédiments. C'est aussi un sédiment que l'on peut enrichir chimiquement.

sédiment témoin dopé, voir SÉDIMENT TÉMOIN ENRICHI.

sédiment témoin enrichi, sédiment témoin non contaminé, auquel, pour les besoins de l'expérience, on a ajouté une substance ou une matière d'essai, par exemple un produit chimique, un mélange de produits chimiques, de la boue (y compris des boues de forage), des déblais contaminés ou du sédiment contaminé, après quoi on a mélangé à fond le tout afin de l'homogénéiser dans tout le sédiment témoin. Syn. SÉDIMENT TÉMOIN DOPÉ.

solution mère, solution concentrée de la substance à soumettre à l'essai. On ajoute des volumes mesurés de la solution mère à de l'eau de dilution afin de préparer des solutions filles à des concentrations voulues.

substance, type particulier de matière possédant des propriétés plus ou moins uniformes.

témoin, au cours d'une enquête ou d'une étude, variante reproduisant toutes les conditions et facteurs qui pourraient influer sur les résultats, sauf sur la condition particulière faisant l'objet de l'étude. Dans un essai toxicologique effectué sur le milieu aquatique, le témoin doit reproduire toutes les conditions d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de substance ou de matière d'essai ajoutée. Le témoin sert à déterminer l'absence de toxicité mesurable qui serait attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. température, santé des organismes soumis à l'essai ou effets dus à leur manipulation).

toxique de référence, produit chimique étalon servant à mesurer la sensibilité des organismes d'essai, afin d'établir le degré de confiance dans les résultats d'essais toxicologiques sur une substance ou une matière donnée. Dans la plupart des cas, l'essai toxicologique employant un toxique de référence sert à évaluer la sensibilité des organismes au moment où on évalue la substance ou la matière d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce produit.

Terminologie statistique et toxicologique

aigu, qui se manifeste dans une courte période (en secondes, en minutes, en heures ou en quelques jours) relativement à la durée de vie de l'organisme d'essai.

CEMO, v. CONCENTRATION AVEC EFFET MINIMAL OBSERVÉ.

CESO, v. CONCENTRATION AVEC EFFET DE SEUIL OBSERVÉ.

chronique, qui survient au cours d'une période relativement longue d'exposition, habituellement une fraction importante de la durée de vie de l'organisme, par exemple 10 % au moins de cette dernière.

CIp, v. CONCENTRATION INHIBITRICE.

CL50, v. CONCENTRATION LÉTALE MÉDIANE.

concentration chronique, moyenne géométrique de la CSEO et de la CEMO observées dans les essais d'exposition chronique. Voir *concentration avec effet de seuil observé (CESO)*, terme recommandé.

coefficient de variation (CV), écart-type (σ) d'un ensemble de données en pourcentage de la moyenne. Se calcule comme suit :

$$CV\ (\%) = 100\ \sigma/\bar{x}.$$

concentration avec effet de seuil observé (CESO), moyenne géométrique de la concentration sans effet observé (CSEO) et de la concentration avec effet minimal observé (CEMO). Équivaut à la concentration maximale admissible de toxique. *Concentration chronique* ou *subchronique* sont d'autres termes, qu'on a utilisés ailleurs et qui pourraient convenir, selon la durée de l'essai.

concentration avec effet minimal observé (CEMO), concentration minimale de substance ou de matière causant, chez l'organisme qui y est exposé, des effets sublétaux observés et statistiquement significatifs. Par exemple, ce pourrait être la concentration minimale qui, à la fin de l'essai, correspond à un poids sec d'organismes exposés significativement inférieur au poids sec des organismes témoins.

concentration inhibitrice (CIp, p désignant le pourcentage d'effet), concentration estimative ponctuelle de la substance ou de la matière d'essai qui inhibe, selon le pourcentage précisé, une fonction biologique quantifiable telle que la croissance. Par exemple, la CI25 pourrait être la concentration qui, estime-t-on, réduit de 25 % le gain de poids sec des organismes d'essai, par rapport au poids sec des organismes témoins à la fin de l'essai. La notion est à utiliser dans tout essai toxicologique mesurant un effet variant de façon continue, par exemple le poids sec à la fin de l'essai, la reproduction ou la respiration.

concentration létale médiane (CL50), concentration de substance ou de matière dans le sédiment (p. ex. en mg/kg) ou l'eau (p. ex. en mg/L) que l'on estime mortelle pour 50 % des organismes d'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % découlent habituellement de l'analyse statistique de la mortalité observée à au moins cinq concentrations, après une période fixe d'exposition. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex. CL50 après 96 h, pour un essai toxicologique de référence avec de l'eau seulement, ou CL50 après 10 jours, pour un essai toxicologique de survie et de croissance mesurant la toxicité d'un sédiment).

concentration sans effet observé (CSEO), concentration maximale d'une substance ou d'une matière d'essai ne causant aucun effet sublétal observé et statistiquement significatif chez

l'organisme exposé. Par exemple, ce pourrait être la concentration maximale à laquelle le poids sec à la fin de l'essai n'est pas significativement inférieur au poids sec des organismes témoins.

CSEO, v. CONCENTRATION SANS EFFET OBSERVÉ.

écart significatif minimal (ESM), écart entre les valeurs obtenues pour chaque variante (dans la présente méthode, c'est l'écart entre les poids moyens ou les taux moyens de mortalité des larves de chironomes), qui devrait exister pour que l'on conclue à un écart significatif entre les groupes. Cette valeur s'obtient au moyen de certains tests statistiques, notamment celui de Dunnett, test normalisé à comparaisons multiples.

effet sublétal, effet nocif pour un organisme, mais en deçà de la concentration qui entraîne directement la mort au cours de l'essai.

ESM, v. ÉCART SIGNIFICATIF MINIMAL.

essai toxicologique, opération visant à déterminer l'effet d'une substance ou d'une matière sur un groupe d'organismes choisis (p. ex. *Chironomus tentans* ou *C. riparius*) dans des conditions précises. Appliqué au milieu aquatique, l'essai permet habituellement de mesurer : *a*) la proportion d'organismes touchés (*essai quantique*) ; et/ou *b*) le degré de l'effet observé (*essai quantitatif* ou *gradué*) après exposition à une substance ou à une matière (p. ex. un échantillon de sédiment) ou à un mélange (p. ex. de sédiments et de produits chimiques).

létal, qui cause directement la mort. Chez *Chironomus* sp., la mort est l'interruption de tous les signes visibles d'activité vitale.

paramètre de mesure, variable (c'est-à-dire temps, réaction des organismes, etc.) indiquant la fin de l'essai ; mesure(s) ou valeur(s) dérivée(s) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex. CL50, CSEO, CEMO, CIp).

précision, mesure de la dispersion (c'est-à-dire de l'écart) de mesures répétées de la même quantité. Elle décrit la certitude entourant un résultat ou la petitesse de l'intervalle dans lequel se situe le résultat du calcul statistique d'un paramètre de mesure, par exemple la CIp.

renouvellement de l'eau, renouvellement de l'eau surnageante des enceintes expérimentales, de façon régulière et mesurée (p. ex. une ou deux fois par jour) pendant toute la durée de l'essai. Peut être manuel ou automatisé. Dans ce dernier cas, il se fait à un rythme constant.

répétition, chaque enceinte expérimentale renfermant le nombre prescrit d'organismes, exposés soit à une concentration de la matière ou de la substance d'essai ou à des essais témoins ou de référence. Un essai toxicologique constitué de cinq échantillons répétés d'un sédiment non dilué prélevé en quatre endroits (y compris un lieu de référence) sur le terrain, plus les échantillons répétés d'un sédiment témoin exigeraient 25 enceintes pour sa réalisation. Pour chaque variante (c'est-à-dire le lieu précis du prélèvement d'un sédiment ou, dans le cas d'un essai portant sur plusieurs concentrations d'un sédiment enrichi par l'ajout de contaminant), on conterait normalement au moins cinq enceintes expérimentales ou répétitions. La répétition est une unité expérimentale indépendante ; c'est pourquoi tout transfert d'organismes ou de matières d'une répétition à l'autre invalide l'essai.

sublétal, nocif pour l'organisme, mais en deçà de la concentration qui entraîne directement la mort au cours de l'essai.

toxicité, capacité propre d'une substance ou d'une matière de provoquer des effets nocifs, létaux ou sublétaux, chez les organismes vivants.

toxicité aiguë, effet négatif discernable (létal ou sublétal) provoqué chez l'organisme d'essai après une courte période d'exposition (dans le cas qui nous occupe, moins de 10 jours) à une substance d'essai.

toxicité chronique, effets à long terme reliés à des modifications du métabolisme, de la croissance, de la reproduction ou de la capacité de survie.

Remerciements

Les auteurs de la présente méthode d'essai biologique sont D.J. McLeay (McLeay Environmental Ltd., Victoria [C.-B.]) et K.E. Day (Direction de la recherche sur les cours d'eau, de l'Institut national de recherche sur les eaux [INRE], Environnement Canada, Burlington [Ont.]).

Au Canada, les premiers travaux d'élaboration de la méthode et le soutien aux essais ont été de K. Day, P. Gillis, P. Hamr, S. Kirby et D. Milani, de l'INRE d'Environnement Canada, au Centre canadien des eaux intérieures (Burlington [Ont.]). Nous remercions P. Hamr, pour ses illustrations et ses descriptions de la systématique générale de C. tentans *et de* C. riparius. *J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Salt Spring Island [C.-B.]) a rédigé, révisé et amélioré les conseils sur le traitement statistique des résultats*

Le présent rapport se fonde sur des rapports antérieurs (publiés ou non) décrivant les modes opératoires et les conditions expérimentales utilisés aux États-Unis, au Canada et en Europe pour l'élevage de Chironomus tentans *ou de* C. riparius *et pour la réalisation d'essais toxicologiques sur les sédiments à l'aide des larves des deux espèces. Les auteurs se sont notamment inspirés des marches à suivre, des conditions précises d'élevage et des essais utilisant* C. tentans *que recommande l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA, 1994a) ainsi que d'études intra- et interlaboratoires ultérieures utilisant* C. riparius, *réalisées par des chercheurs canadiens et américains (Milani* et al., *1996). Pour ce qui concerne l'élaboration de la méthode et les études de validation (Milani* et al., *1996), nous sommes particulièrement reconnaissants, pour leur participation et leur contribution, aux personnes et aux organismes suivants : D. Milani et S. Kirby (INRE) ; K. Doe (Environnement Canada, Moncton [N.-B.]) ; K. Holtze (B.A.R. Environmental Inc., Guelph [Ont.]) ; A. Putt (Springborn Laboratories Inc., Warehan [Maryland]) ; P. Riebel (Beak Consultants Ltd., Dorval [Qc]) et G. van Aggelen (Environnement Canada, North Vancouver [C.-B.]).*

R.P. Scroggins (Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa [Ont.]) a joué le rôle d'autorité scientifique, fournissant des ressources et une orientation techniques au projet, durant sa réalisation. Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA, annexe A) ont participé à l'élaboration et à l'examen du document, et nous les en remercions. Nous tenons à souligner en particulier les nombreuses observations utiles formulées par chaque membre du comité d'experts scientifiques d'Environnement Canada chargé de la première et de la dernière révision du document : G.T. Ankley (USEPA, Duluth [MN]) ; D. Bedard (ministère de l'Environnement et de

l'Énergie de l'Ontario, Etobicoke [Ont.]) ; G.A. Burton Jr. (université d'État Wright, Dayton [OH]) ; M. Hamer (Zeneca Agrochemicals, Berkshire [Royaume-Uni]) ; C.G. Ingersoll (U.S. Geological Survey, Columbia [MO]) ; K. Liber (université du Wisconsin, Superior ([WI]) ; C. Naylor (université de Sheffield au Royaume-Uni) ; D. Pascoe (collège de l'Université de Wales à Cardiff, Cardiff [Royaume-Uni]). Trois des principaux auteurs du document USEPA (1994a), c'est-à-dire C.G. Ingersoll, G.T. Ankley et G.A. Burton, ont fait partie du comité d'experts scientifiques d'Environnement Canada.

Outre les membres du comité consultatif scientifique d'Environnement Canada, qui ont contribué à l'élaboration de la méthode, les personnes suivantes ont relu l'ébauche finale et ont formulé de nombreuses observations utiles : D. Bedard et G. Westlake (ministère de l'Environnement et de l'Énergie de l'Ontario, Etobicoke [Ont.]), J. Black (EA Eng. Sci. Tech. Inc., Sparks [MD]) ; R.L. Breton (Environnement Canada, Ottawa) ; R.J. Casey (Centre environnemental de l'Alberta, Vegreville) ; P. Dohmen (BASF, Limburgerhof [Allemagne]) ; P. Downey (TRAC Laboratories Inc., Denton, TX) ; C.W. Hickey (NIWA Ecosystems, Hamilton [Nouvelle-Zélande]) ; R.A. Hoke (SAIC, Hackensack [NJ]) ; D.R. Oliver (Agriculture Canada, Ottawa) ; F. Quiniou (IFREMER, Plouzané [France]) ; C. Roghair (RIVM, Pays-Bas) ; P.V. Winger (université de la Géorgie, Athens).

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais toxicologiques en milieu aquatique pour mesurer et contrôler les effets toxiques de substances ou de mélanges complexes de substances qui pourraient être nocives pour les organismes aquatiques indigènes présents dans l'environnement (eau et sédiments). Les résultats de ces essais peuvent révéler la nécessité de réglementer les rejets, de fixer des normes aux effluents ou trouver des applications dans la recherche et ailleurs. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode réponde aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA, annexe A) et Environnement Canada ont proposé, en 1987, d'élaborer un ensemble d'essais normalisés de mesure de la toxicité en milieu aquatique qui serait généralement acceptable au Canada. À l'époque, il a été décidé qu'il fallait une batterie de méthodes de dosage biologique approuvées à l'échelon fédéral qui permettrait de mesurer différents effets toxiques à l'aide de différentes substances ou matières d'essai (p. ex. échantillons de produits ou de substances chimiques, d'effluents, d'eaux réceptrices ou de sédiments) et d'organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxonomiques (Sergy, 1987). Dans le cadre de cette entreprise permanente, Environnement Canada et le GITA ont recommandé la mise au point d'un certain nombre d'essais normalisés de mesure de la toxicité des sédiments pour servir couramment à prévenir, à évaluer et à réduire la contamination des sédiments et à gérer les sédiments contaminés.

Dans le milieu aquatique, les sédiments hébergent de nombreux organismes, tout en étant un dépôt important de nombreuses substances chimiques parmi les plus persistantes qui pénètrent dans les eaux de surface. De plus en plus, les faits montrent que, dans les sédiments ou à proximité, il y a dégradation de l'environnement, y compris des effets indésirables chez les organismes aquatiques, même lorsque les critères fédéraux ou provinciaux de qualité de l'eau sont respectés. D'autres indices montrent que les sédiments peuvent être contaminés par de fortes concentrations de produits chimiques dont on a lieu de s'inquiéter de leur toxicité ; pourtant le benthos ou l'épibenthos sont diversifiés et ils ne semblent souffrir d'aucune atteinte. Les essais de mesure de la toxicité des sédiments sont des moyens à la fois efficaces et peu coûteux de déterminer si les contaminants des sédiments sont nocifs pour le benthos, l'épibenthos et les organismes fréquentant la colonne d'eau au-dessus. Ces essais peuvent servir à diverses fins, notamment :

- déterminer la répartition spatio-temporelle des contaminants dans les sédiments qui sont toxiques pour les organismes benthiques ou épibenthiques ;
- mesurer la toxicité des déblais de dragage et les autres matières que l'on envisage d'immerger dans les eaux de surface ;

- classer les milieux aquatiques contigus aux emplacements industriels selon leur qualité ou selon les besoins de la décontamination ;
- évaluer l'intégrité de l'environnement des lieux approuvés d'immersion ;
- estimer l'efficacité des pratiques de gestion ou de décontamination ;
- étudier les interactions présentant une certaine importance écologique entre les contaminants des sédiments et l'eau au-dessus ;
- comparer la sensibilité relative des divers organismes benthiques et épibenthiques ;
- déterminer le rapport entre les effets toxiques et la biodisponibilité des contaminants des sédiments.

Au laboratoire, on peut utiliser les résultats des essais toxicologiques dans lequel on utilise des échantillons de sédiment propre, enrichis de différentes concentrations de contaminants pour évaluer les rapports de cause à effet entre les produits chimiques et les réactions biologiques. L'évaluation environnementale de la qualité des sédiments dans les dimensions spatiales (horizontale et/ou verticale) et temporelle est des plus efficaces si elle intègre une batterie d'essais convenables de mesure de la toxicité des sédiments dans des études des propriétés chimiques (y compris l'analyse du sédiment global et de l'eau de porosité) et des études biologiques des sédiments.

Les laboratoires régionaux d'Environnement Canada (annexe B) participent activement à des études visant à élaborer et à normaliser les méthodes de dosage biologique de la toxicité d'échantillons de sédiment contaminé. On a mis au point un essai utilisant une à six espèces d'amphipodes marins ou estuariens communs aux eaux côtières canadiennes du Pacifique ou de l'Atlantique (EC, 1992a), et on dispose d'une méthode de mesure rapide de la toxicité des échantillons de sédiment, d'eau de porosité ou d'élutriat à l'aide de bactéries luminescentes (EC, 1992b). Environnement Canada a publié un essai de mesure de la survie et de la croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments (EC, 1997a) et il travaille à un esai de mesure de la survie et de la croissance, dans les sédiments, de vers polychètes marins ou estuariens d'élevage, communs aux eaux côtières canadiennes (EC, 1997b). On peut également utiliser, pour mesurer la toxicité d'un sédiment, de l'eau de porosité ou d'un élutriat, d'autres méthodes d'Environnement Canada, parce qu'elles se fondent sur l'emploi d'organismes sensibles vivant dans la colonne d'eau, mais entrant souvent en contact étroit avec le sédiment (p. ex. EC, 1990a, 1992c, d et e). Sont également accessibles des guides décrivant les marches à suivre pour la collecte et la manipulation des échantillons de sédiment ou pour l'enrichissement d'un sédiment non contaminé en vue d'essais toxicologiques de référence (EC, 1994 et 1995).

La méthode de dosage biologique exposée dans le présent document constitue le mode opératoire normalisé de mesure de la toxicité chronique d'un sédiment. Elle emploie des larves de chironomes dulcicoles (*Chironomus tentans* ou *C. riparius*), dont elle chiffre la survie et le poids à la fin de l'essai. La vaste aire de répartition du genre *Chironomus*, communément inféodé aux sédiments des eaux douces, son importance écologique, sa facilité d'élevage et d'emploi dans les essais, sa croissance rapide, son cycle biologique court, sa sensibilité aux

sédiments contaminés et son emploi répandu dans les essais de mesure de la toxicité des sédiments, tout cela a mené au choix de cette méthode pour son uniformisation par Environnement Canada. La présente méthode est assortie de deux options expérimentales : (1) renouvellement périodique, deux fois par jour, de l'eau recouvrant le sédiment des enceintes expérimentales, conformément au mode opératoire de l'USEPA (1994a) et de l'ASTM (1995a), normalement sans aération de cette eau ; (2) conditions statiques, sans renouvellement (sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation), mais avec aération continue de l'eau surnageante. Dans les deux cas, on nourrit les animaux de flocons moulus pour poissons tropicaux, à raison soit d'une ration journalière de 6,0 mg de matières solides sèches par repas, soit quatre fois seulement (en des journées non consécutives) d'une ration de 15,0 mg de matières solides sèches par repas.

Traditionnellement, les chercheurs canadiens, américains et européens ont eu recours à diverses méthodes d'élevage et d'essai avec des échantillons de sédiments d'eau douce et de larves de chironomes d'eau douce (*C. tentans* ou *C. riparius*) élevées en laboratoire. On trouvera un résumé partiel de ces méthodes, de leurs similitudes et de leurs différences dans les annexes C, D et E. Parmi les méthodes dignes de mention qui sont à l'état d'ébauche, qui ont été publiées ou qui sont utilisées à l'interne pour l'élevage des chironomes (*Chironomus* sp.) et pour la mesure de leurs réactions aux sédiments ou à d'autres matières et qui ont inspiré la préparation de la présente méthode de dosage biologique, mentionnons celles de : Credland, 1973a ; Townsend *et al.*, 1981 ; Nebeker *et al.*, 1984 ; McCahon et Pascoe, 1988 ; Ingersoll et Nelson, 1990 ; ASTM, 1991a, 1994 et 1995a ; USEPA, 1991a et 1994a ; Bedard *et al.*, 1992 ; Hoke, 1992 ; NWRI, 1992 ; Ankley *et al.*, 1993 ; Call *et al.*, 1993a. Ont revêtu une importance particulière et exercé une influence notable les nouvelles méthodes de l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA), permettant de mesurer la toxicité de contaminants des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles (USEPA, 1994a), qui nous ont été aimablement communiqués à l'état d'ébauches[1]. En grande partie intégrées dans la compilation des méthodes normalisées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants dans les sédiments par l'ASTM (1995a), elles comprennent un essai d'une durée de 10 jours pour la mesure des effets qu'exercent les sédiments sur la survie et la croissance des larves de *C. tentans*[2]. La présente méthode de dosage biologique s'inspire beaucoup : des modes opératoires exposés dans le détail dans USEPA (1994a), pour l'élevage de *C. tentans* et son emploi dans des essais ; des études intra- et interlaboratoires utilisant *C. riparius*, en conditions statiques ou avec renouvellement intermittent de l'eau, entreprises ou

---

1. Préparé par le United States Freshwater Sediment Toxicity Assessment Committee, ce rapport (USEPA [1994a]) reflétait le consensus des chercheurs américains et canadiens activement engagés dans les dosages biologiques de la toxicité des sédiments, y compris des essais employant des larves de chironomes dulcicoles (*C. tentans* ou *C. riparius*) [Burton et Ingersoll, 1994 ; Ingersoll *et al.*, 1995 ; Burton *et al.*, 1996).

2. ASTM (1995a) comprend une variété de modes opératoires pour l'élevage de *C. riparius* et de *C. tentans* et leur utilisation dans les essais, de même que des lignes directrices pour l'exécution d'essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de plusieurs autres espèces d'invertébrés dulcicoles.

coordonnées par des chercheurs d'Environnement Canada afin d'élaborer et de valider la présente méthode (Milani *et al.*, 1996).

Nous décrivons les méthodes universelles de préparation et de réalisation des essais toxicologiques appliqués aux sédiments et utilisant *C. tentans* ou *C. riparius*. Nous présentons aussi les conditions et modalités précises à suivre ou recommandées pour l'évaluation de différents types de substances ou de matières (p. ex. échantillons de sédiment prélevés sur place ou de déchets particulaires ou, encore, échantillons d'au moins une substance ou d'un produit chimique mélangé pour les besoins de l'expérience à un sédiment naturel ou reconstitué, ou mis en contact avec ce dernier). La figure 1 donne l'organigramme général des sujets universels que nous abordons et il énumère les sujets propres aux échantillons de sédiment prélevés sur le terrain, aux échantillons de déchets particulaires semblables (p. ex. boues, boue de forage ou déblais de dragage) ou, encore, aux échantillons de sédiment enrichi expérimentalement par l'ajout de produit(s) ou de substance(s) chimique(s), de sédiment contaminé ou de déchets particulaires.

Nous avons élaboré la méthode après examen des variantes de méthodes d'élevage et d'essai énoncées dans les méthodes [3] canadiennes, américaines et européennes décrivant la préparation et la réalisation des essais toxicologiques appliqués aux sédiments et utilisant des larves des chironomes dulcicoles *C. tentans* ou *C. riparius*. L'annexe C résume les variantes actuelles et antérieures des méthodes d'élevage de ces espèces. L'annexe D résume les variantes actuelles ou antérieures des essais de survie et de croissance pour la détermination de la toxicité d'un sédiment à l'aide de chironomes. L'annexe E résume les variantes interlaboratoires des conditions et des marches à suivre des essais toxicologiques de référence avec des chironomes *dans l'eau seulement*.

Les paramètres biologiques de mesure de la méthode sont le pourcentage moyen de survie et le poids sec moyen (lequel est un indice de la croissance) à la fin des 10 jours de l'essai. La méthode est destinée à l'évaluation de la toxicité d'échantillons des matières suivantes :

(1) sédiments d'eau douce prélevés sur le terrain ;

(2) boues industrielles ou urbaines et déchets particulaires semblables qui pourraient influer sur l'environnement dulcicole ;

(3) mélange d'au moins un produit ou une substance chimique dans la masse des sédiments d'eau douce ou les recouvrant.

Environnement Canada (1997a) a également mis au point un essai d'une durée de 14 jours pour mesurer les effets toxiques de ces matières sur la survie et la croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca*. L'essai peut servir en même temps que la présente méthode ou la remplacer.

En formulant ces modes opératoires, nous nous sommes efforcés de trouver le juste

---

3. Pour préparer les listes des variantes des marches à suivre (v. annexes C, D et E), nous avons notamment utilisé les documents suivants : guides pratiques publiés, modes opératoires normalisés, mais inédits, des établissements et laboratoires de l'État, ainsi qu'ébauches de rapports. Nous les énumérons dans ces annexes sous le nom de l'organisme dont ils émanent, plutôt que sous celui de l'auteur. Cependant, nous y donnons le nom de l'auteur et nous indiquons les renvois officiels.

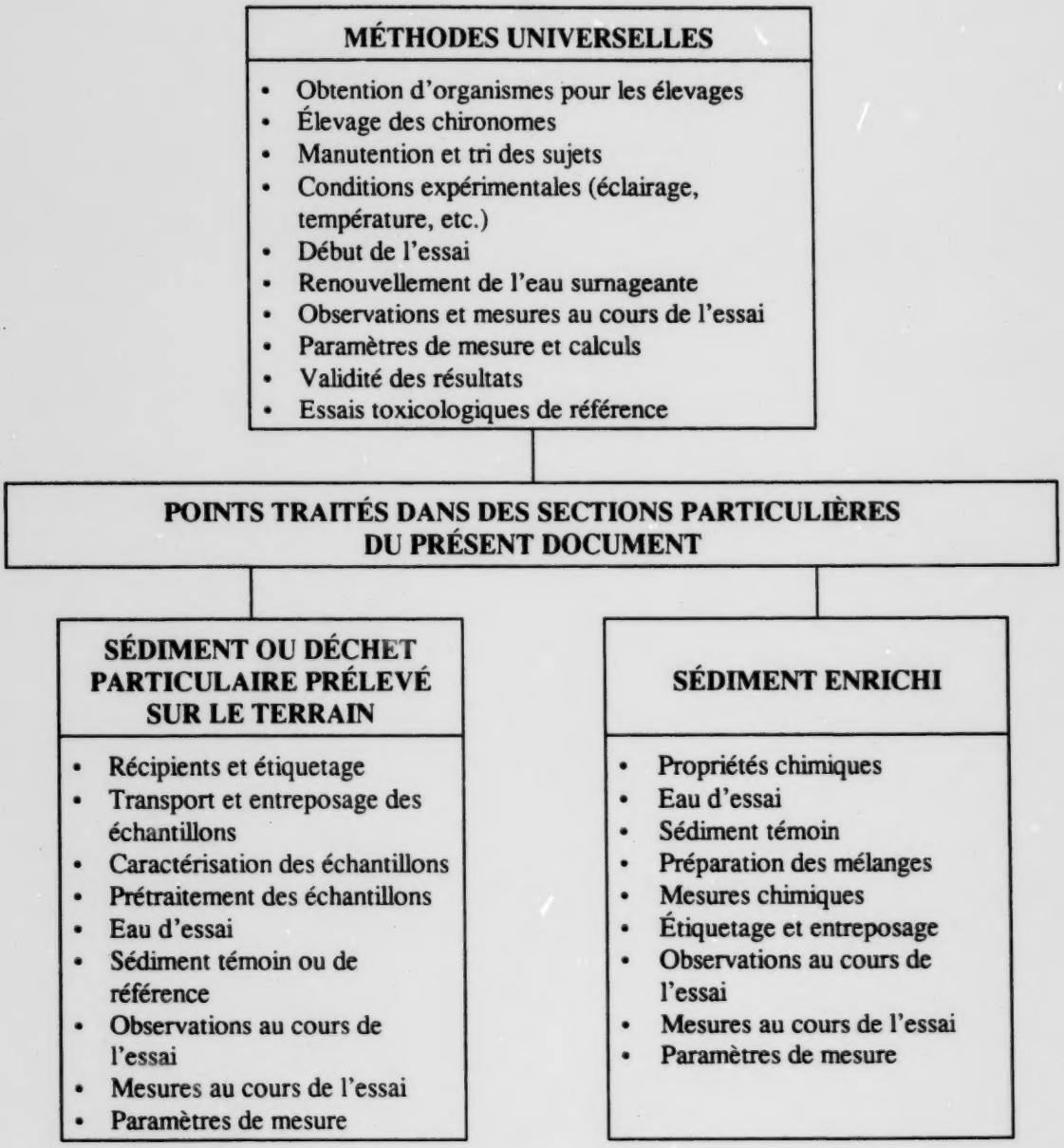


Figure 1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais toxicologiques avec des chironomes et divers types de substances et de matières

milieu entre les considérations scientifiques et pratiques ainsi que les coûts, tout en nous assurant que les résultats seront assez précis pour la plupart des situations auxquelles on les appliquera. Nous posons que l'utilisateur possède une certaine connaissance des essais toxicologiques appliqués au milieu aquatique. Nous ne fournissons pas les explications qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire, bien que le présent document se veuille un guide utile à cette application et à d'autres.

Pour savoir comment appliquer la méthode et d'autres méthodes biologiques ainsi que pour se renseigner sur l'interprétation et l'application des paramètres de mesure, prière de consulter Environnement Canada (1997a).

1.2 Identification, répartition, cycle biologique

Chironomus tentans et *C. riparius* (diptères : Chironomidae) sont des mouches non piqueuses appelées chironomes, dont l'aire de distribution est vaste (holarctique). Nous décrivons et présentons les caractéristiques de *C. tentans* dans l'annexe F, en donnant des renseignements sur l'aire de répartition et le cycle vital de l'espèce. L'information analogue sur *C. riparius* figure l'annexe G.

Ces insectes possèdent quatre stades vitaux : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte. Après l'accouplement, les femelles de chaque espèce pondent chacune une seule masse gélatineuse et transparente d'œufs, directement sur la couche superficielle de l'eau des lacs, des étangs ou des cours d'eau[4]. Le nombre d'embryons par masse d'œufs peut s'élever en moyenne à 2 300, dans le cas de *C. tentans*[5] (ASTM, 1995a) et à 150 à 450 dans le cas de *C. riparius* (Ingersoll *et al.*, 1990). Dans l'eau de 19 à 23 °C, l'éclosion des œufs de chaque espèce suit deux à quatre jours plus tard (ASTM, 1995a). Le deuxième ou le troisième jour après l'éclosion, les larves fouissent dans le sédiment et entreprennent de construire des tubes (ou des fourreaux) ouverts aux deux extrémités. Les larves de chaque espèce se nourrissent de détritus et de l'endofaune. La croissance des larves franchit quatre stades d'environ quatre à sept jours chacun, selon la température. Suit la nymphose, qui dure environ trois jours, au terme desquels émerge l'adulte terrestre. Le stade de l'adulte dure de trois à cinq jours, au cours desquels les adultes s'accouplent en vol, et les femelles pondent leurs masses d'œufs (Townsend *et al.*, 1981 ; ASTM, 1991a, 1994 ; Call *et al.*, 1993a ; USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a).

Les larves constituent un élément important du régime des poissons et des oiseaux aquatiques (Townsend *et al.*, 1981 ; ASTM, 1995a). La plupart se trouvent dans les quelques centimètres supérieurs des sédiments. Elles sortent souvent leur extrémité antérieure de leur tube et elles se nourrissent à la surface du sédiment. On a trouvé très peu de *C. tentans* à plus de 40 cm de profondeur ; cependant, *C. riparius* pourrait vivre à des profondeurs de 1 m. On

---

4. Parfois, la femelle de *C. tentans* élevée en laboratoire pond une deuxième masse d'œufs, plus petite, dans les 24 heures qui suivent. On n'est toutefois pas sûr de sa viabilité (K. Liber, Université du Wisconsin, Superior [WI], communication privée, 1994).

5. Dans certains laboratoires, le nombre moyen pourrait parfois n'être que de 800 à 1 500 (K. Liber, Université du Wisconsin, Superior [WI], communication privée, 1994).

a observé des larves de *C. tentans* dans les sédiments dont la granulométrie allait de moins de 0,15 à 2,0 mm. On a observé celles de *C. riparius* dans divers substrats, y compris le limon, les fonds de calcaire, le gravier (ASTM, 1991a, 1994, 1995a).

On a retrouvé dans des lacs de la Colombie-Britannique des larves de *C. tentans*, à des températures de 0 à 24 °C, à des teneurs en OD de 0,2 à 8,2 mg/L, au pH de 8,0 à 9,2, à une conductivité de 481 à 4 136 µS/cm et à une teneur en carbone organique dans les sédiments de 1,9 à 15,5 % ; mais la larve était absente des eaux où la concentration de sulfure d'hydrogène excédait 0,3 mg/L (Topping, 1971). D'autres études ont établi à 0 à 35 °C la fourchette de température des milieux où vit la larve de cette espèce et à 7 à 10 sa gamme de pH (ASTM, 1995a). Dans la nature, on trouverait les larves de *C. riparius* dans la fourchette de 0 à 33 °C, à des concentrations d'OD d'à peine 1 mg/L et aux pH de 5 à 9 (ASTM, 1995a). Dans les annexes F et G, on trouvera des précisions supplémentaires sur le cycle biologique et la répartition de *C. tentans* et de *C. riparius*, respectivement.

1.3 Emploi antérieur dans les essais toxicologiques

Burton (1991) donne un excellent survol des diverses méthodes ayant servi à déterminer la toxicité aiguë et chronique des sédiments d'eau douce, y compris des essais employant des larves de chironomidés et d'autres insectes aquatiques. Wentsel *et al.* (1977a) ont signalé pour la première fois un test pour mesurer les effets chroniques (17 jours) d'un sédiment contaminé sur la survie et la croissance du deuxième stade larvaire du chironome *C. tentans*. Nebeker *et al.* (1984) ont décrit des méthodes pour étudier les effets d'échantillons de sédiment contaminé sur la survie et la croissance du deuxième stade larvaire de *C. tentans* (au bout de 15 jours) et sur l'émergence des adultes (au bout de 25 jours). Les résultats de chacune de ces méthodes ont été communiqués (Nebeker *et al.*, 1988). Ingersoll et Nelson (1990) ont publié le mode opératoire et les résultats d'essais de la mesure de la toxicité de sédiments d'une durée de 13 jours (mesure de la croissance et de la survie) ou de 29 jours (sortie des adultes), au moyen du premier stade larvaire de *C. riparius*. Benoit et Ankley (1993) ont décrit des méthodes qui s'étendent sur une partie du cycle biologique (du premier stade larvaire à la sortie des adultes) de *C. tentans*, à l'aide d'échantillons de sédiment. Ingersoll *et al.* (1995) ont examiné les méthodes et les applications des essais de mesure de la toxicité des sédiments au moyen de larves de chironomidés.

Les comptes rendus d'essais de mesure de la toxicité chronique d'échantillons de sédiments prélevés sur le terrain, fondée sur la survie et de la croissance, au bout de 10 à 14 jours, de larves de *C. tentans* ou de *C. riparius* sont désormais chose courante (p. ex. Giesy *et al.*, 1990 ; Othoudt *et al.*, 1991 ; Ankley *et al.*, 1993 ; Becker et Bigham, 1993 ; Call *et al.*, 1993b ; Sibley *et al.*, 1993 ; Kemble *et al.*, 1994 ; Becker *et al.*, 1995 ; Day *et al.*, 1995a et b ; Reynoldson *et al.*, 1995 ; Bedard et Ali, 1996 ; Burton *et al.*, 1996 ; Milani *et al.*, 1996). Parfois, les essais employant des larves de chironomidés et des échantillons de sédiment prélevés sur le terrain se sont bornés au paramètre biologique de la survie (p. ex. Schubauer-Berigan et Ankley, 1991 ; West *et al.*, 1993), et la durée des essais a parfois été de quatre jours à peine. Les chercheurs ont parfois extrait l'eau de porosité d'échantillons de sédiment prélevés

sur le terrain ou préparé des élutriats aqueux d'échantillons de sédiment, puis ils en ont mesuré les effets sur la croissance ou la survie des larves de chironomidés (Giesy *et al.*, 1990 ; Sibley *et al.*, 1993). Parfois, on a signalé des essais de mesure de la toxicité, pour les larves, d'échantillons de sédiment contaminé, dilué dans un sédiment témoin non contaminé (Giesy *et al.*, 1990). L'USEPA et le United States Army Corps of Engineers (USEPA/USACE, 1994) ont recommandé l'emploi de *C. tentans* et/ou *C. riparius* pour l'évaluation de la toxicité aiguë ou chronique des déblais de dragage dont on envisage l'immersion dans les eaux intérieures.

On a effectué de nombreux essais de la létalité aiguë *dans l'eau seulement*, en présence de divers produits chimiques organiques ou inorganiques, à l'aide de larves de chironomidés (*C. tentans* ou *C. riparius* ; du premier au quatrième stades larvaires, selon l'essai) et, parfois, à l'aide d'autres espèces d'invertébrés dulcicoles (p. ex. Gauss *et al.*, 1985 ; Green *et al.*, 1985 et 1986 ; Williams *et al.*, 1985, 1986a et b ; Powlesland et George, 1986 ; Brown et Pascoe, 1988 ; Ingersoll *et al.*, 1990). Habituellement, ces essais ont duré de deux à quatre jours. On a également effectué de plus longs essais dans l'eau seulement (de 10 à 30 jours) à l'aide de substances chimiques et de larves de chironomidés, les paramètres biologiques de mesure ayant été la survie, la survie et la croissance ou la sortie des adultes (p. ex. Powlesland et George, 1986 ; Pascoe *et al.*, 1989 ; Ingersoll *et al.*, 1990 ; Taylor *et al.*, 1991a et b ; Suedel *et al.*, 1993a ; West *et al.*, 1993 ; Hoke *et al.*, 1995 ; Schubauer-Berigan *et al.*, 1995). Parfois, on a mis du substrat à la disposition des larves de chironomidés (Pascoe *et al.*, 1989 ; Taylor *et al.*, 1991a et b), bien que la plupart de ces essais dans l'eau seulement se soient passés de substrat.

Les essais visant à mesurer la qualité des sédiments ou de l'eau à l'aide des larves de chironomidés ont comporté un certain nombre d'autres approches et d'applications. Plusieurs études ont comporté l'enrichissement d'un sédiment témoin non contaminé par des contaminants inorganiques ou organiques, les essais toxicologiques ultérieurs ayant employé les larves de *C. tentans* ou de *C. riparius* et ayant mesuré, comme paramètres biologiques la survie, la survie et la croissance ou la sortie des adultes (Cairns *et al.*, 1984 ; Pittinger *et al.*, 1989 ; Lydy *et al.*, 1990 ; Douglas *et al.*, 1993 ; Harrahy et Clements, 1993 ; Suedel *et al.*, 1993a ; Hoke *et al.*, 1995 ; Whiteman *et al.*, 1996). On a parfois mesuré comme paramètres biologiques les effets quantitatifs des contaminants présents dans le sédiment ou l'eau sur le comportement des larves de chironomidés (p. ex. pourcentage de larves évitant le sédiment contaminé ; pourcentage chronométré de larves fouissant dans le sédiment et y construisant des tubes) ou le comportement des adultes (p. ex. le nombre d'oothèques pondues dans une gamme de concentrations de produits chimiques dans l'eau) [Wentsel *et al.*, 1977b et 1978 ; Pascoe *et al.*, 1991 ; Suedel *et al.*, 1993a). On a entrepris la mesure sur place de la toxicité des sédiments ou de l'eau au-dessus à l'aide de larves en cages de *C. tentans* (Nebeker *et al.*, 1984) ou de *C. riparius* (Ormerod *et al.*, 1987). Des essais *dans l'eau seulement* ou avec du *sédiment entier* ont permis de mesurer, à l'aide de larves de chironomidés, la bioaccumulation et l'élimination de certains contaminants préoccupants, soit à la fin d'un essai toxicologique, soit dans un essai séparé

(Dodge et Theis, 1979 ; Mosher *et al.*, 1982 ; Nebeker *et al.*, 1984 ; Lydy *et al.*, 1990 et 1992 ; Taylor *et al.*, 1991b ; Harrahy et Clements, 1993).

On a examiné les résultats des essais de mesure de la toxicité des sédiments en laboratoire à l'aide de *C. tentans* ou de *C. riparius* pour en évaluer l'utilité pour la détermination des lieux où le benthos naturel pâtit de la présence des contaminants toxiques dans les sédiments (Wentsel *et al.*, 1977a et b ; Giesy *et al.*, 1988 et 1990 ; Becker et Bigham, 1993 ; Burton et Ingersoll, 1994 ; USEPA, 1994a ; Day *et al.*, 1995a). Ces études de *validation sur le terrain* intègrent habituellement les résultats d'essais toxicologiques en laboratoire, d'analyses chimiques simultanées des échantillons de sédiment et des relevés de la diversité et de l'abondance des communautés benthiques, par l'approche dite de la *triade de qualité des sédiments* (Chapman *et al.*, 1986, 1987, 1991) ou une approche semblable. Jusqu'à ce jour, les études montrent que les essais de mesure de la toxicité d'un sédiment à l'aide de larves de chironomidés peuvent donner une indication fiable de la contamination nocive des sédiments sur le terrain. Par exemple, Wentsel *et al.* (1977a et b ; 1978) ont mis en évidence une corrélation entre l'abondance des larves de *C. tentans* dans les endroits où les sédiments ont été contaminés par des métaux et les réactions sublétales de *C. tentans* à ces sédiments en laboratoire. Les études de Giesy *et al.* (1988, 1990) ont montré la corrélation entre les endroits où les larves de *C. tentans* ont été éliminées des sédiments contaminés de la rivière Detroit et l'observation, en laboratoire, d'une réduction de 30 à 50 % de la croissance des larves de l'espèce gardées dans des échantillons de sédiment provenant du même endroit.

1.4 Tolérance et sensibilité relative en laboratoire

Robustes, les larves de chironomidés peuvent tolérer une large gamme de conditions en laboratoire. Townsend *et al.* (1981) ont résumé la tolérance de *C. tentans* à divers températures, teneurs en OD, pH et régimes d'éclairage en laboratoire. Les températures de 15 à 28 °C ont toutes autorisé un taux élevé (d'au moins 95 %) d'éclosion des embryons ; les températures plus extrêmes ont abaissé la réussite de l'éclosion. On a montré que la croissance des larves de *C. tentans* s'arrêtait à moins de 8 °C. Le taux de réussite de l'éclosion de l'espèce était normal lorsque la teneur en OD variait de 1 à 12 mg/L, tandis que l'embryogenèse s'interrompait à moins de 1 mg/L. Lorsque la concentration d'OD est de 3 mg/L ou moins, les larves de *C. tentans* ont tendance à migrer dans la colonne d'eau et à commencer à construire leur tube à l'extérieur du sédiment[6]. *C. tentans* s'est développé de façon normale aux pH de 5,5 ou de 6,5, tandis qu'au pH de 4,5, le taux de sortie des adultes a été réduit de 60 % et qu'au pH de 3,5, le taux de mortalité des larves du premier stade a été de 100 %. Une courte photopériode (de 8 h) s'est révélée arrêter le développement des larves du quatrième stade ; le développement a été normal à compter d'une photopériode de 16 h jusqu'à 24 h (Townsend *et al.*, 1981).

Les larves de *C. tentans* et de *C. riparius* peuvent tolérer une large gamme de substrats. Ingersoll et Nelson (1990)

---

6. On a observé que les larves de *C. tentans* se comportaient normalement lorsque la concentration d'OD était d'environ 3 mg/L, même pendant plusieurs jours (K. Liber, université du Wisconsin, Superior [WI], communication privée, 1994).

signalent que l'on peut élever *C. riparius* au laboratoire dans un sédiment propre dont la granulométrie varie de plus de 90 % de limon et d'argile jusqu'à 100 % de sable, sans effet négatif sur la survie ou la croissance. Bedard (1989) note que la croissance des larves de *C. tentans* en laboratoire est améliorée dans les substrats grossiers comportant plus de 80 % de sable. Les résultats d'essais d'une durée de 10 jours avec des larves de *C. tentans* conservées dans 50 échantillons de sédiment non contaminé des Grands Lacs d'une granulométrie qui allait de 95 % d'argile à 100 % de sable et d'une teneur en carbone organique qui allait de 0,3 à 8,1 % portent à croire que la croissance pourrait être légèrement déterminée par la granulométrie, étant quelque peu meilleure dans les sédiments grossiers (Ankley *et al.*, 1994). Des essais d'une durée de 10 jours avec des larves de *C. riparius* en présence de sédiment non contaminé d'une teneur en carbone organique de 0,6 à 8,8 % ont révélé que, dans cet intervalle, la concentration de carbone organique n'influait pas sur la survie et la croissance de façon significative (Milani *et al.*, 1996). Dans les études du cycle biologique en présence de sédiments artificiels de laboratoire, Suedel *et al.* (1993b) ont observé que *C. tentans* tolérait toutes les compositions granulométriques examinées (c'est-à-dire de 0 à 100 % de sable, de 0 à 100 % de limon et de 0 à 60 % d'argile), mais qu'il ne tolérait pas le sédiment artificiel témoin d'une faible teneur en carbone organique (≤ 1,0 %). Par des études d'une durée de 10 jours employant un sédiment témoin artificiel, Suedel et Rodgers (1994a) ont constaté que les larves de *C. tentans* survivaient bien si la teneur en matière organique était de 3 à 5 %, tandis qu'un taux de 0,5 % provoquait une réduction considérable du taux de survie et que seulement 33 % des larves survivaient dans un sédiment témoin artificiel à teneur nulle en matière organique. Suedel et Rodgers (1994b) signalent des constatations semblables, de même que des résultats montrant un taux convenable de survie (≥ 80 %) de *C. tentans* nourris et gardés 10 jours dans un sédiment artificiel renfermant 2,5 % de matière organique et dont la granulométrie variait de 100 % de sable à 100 % de limon. Suedel et Rodgers (1994b) ont également observé de faibles taux de survie (de 10 à 50 %) de *C. tentans* recevant une ration journalière au cours d'une exposition de 10 jours à plusieurs échantillons de sédiment prélevés dans des « localités relativement pures », où le taux de matière organique était faible (0,12 à 0,19 %).

Par un certain nombre d'études, on a comparé la vulnérabilité des divers stades de l'évolution de *C. tentans* ou de *C. riparius* aux contaminants du milieu aquatique. Dans des essais n'utilisant que de l'eau ou des essais dans des sédiments enrichis, les œufs étaient en général très résistants aux toxiques, comparativement aux larves qui venaient d'éclore (Gauss *et al.*, 1985 ; Williams *et al.*, 1987). D'après des essais de mesure des effets aigus ou chroniques par comparaison de la sensibilité de divers stades larvaires, la tolérance augmente peu à peu, d'un stade larvaire au suivant (Gauss *et al.*, 1985 ; Powlesland et George, 1986 ; Williams *et al.*, 1986b ; Pascoe *et al.*, 1989). Par exemple, les essais *dans l'eau seulement* d'exposition au cuivre ont montré que le premier stade larvaire de *C. tentans* était de 12 à 27 fois plus sensible que le quatrième (Gauss *et al.*, 1985) ; des essais semblables avec le cadmium et *C. riparius* ont montré que les larves du premier stade étaient

127 fois plus vulnérables que celles du deuxième et 950 fois plus que celles du quatrième (Williams *et al.*, 1986b). Les essais *dans l'eau seulement* de mesure de la toxicité aiguë du nickel pour *C. tentans* ont montré que les larves du premier stade étaient deux fois plus vulnérables que celles du deuxième stade. Les essais de mesure de la toxicité chronique du cadmium pour *C. riparius* ont montré que les nymphes étaient aussi tolérantes que les larves du quatrième stade (Pascoe *et al.*, 1989). Dans les études du cycle biologique de *C. riparius* exposé au lindane, Taylor *et al.* (1993) ont constaté que la nymphose et la sortie des adultes étaient les paramètres de mesure les plus sensibles ; cependant, ces auteurs n'ont pas mesuré les différences de poids des larves et ils ont laissé entendre que la croissance pourrait être un paramètre plus sensible que les réactions intégrées que livrent les essais sur le cycle biologique.

Les résultats des essais effectués *dans l'eau seulement* et des essais avec du *sédiment entier* utilisant les larves de *C. tentans* ou de *C. riparius* montrent de façon convaincante que la croissance est un paramètre sensible de mesure, souvent beaucoup plus que les taux de survie au bout d'une exposition à une toxicité aiguë ou chronique. Par exemple, Powlesland et George (1986) ont comparé les résultats d'essais d'une brève (48 h) et d'une longue (30 j) exposition de larves de *C. riparius* à de l'eau seulement et du nickel : la croissance au bout de 30 jours est un paramètre de mesure 73 fois plus sensible que la survie des larves du premier stade au bout de 48 h. Par une série d'essais de mesure de la survie et de la croissance d'une durée de 10 jours exposant des larves de *C. riparius* du deuxième stade à divers produits chimiques dans l'eau, Taylor *et al.* (1991b) ont constaté que les concentrations « chroniques » fondées sur la croissance étaient de 6 à 100 fois plus sensibles (inférieures) aux concentrations fondées sur la survie. De nombreux essais de mesure de la survie et de la croissance d'une durée de 10 jours de larves de *C. tentans* exposées à des échantillons de sédiment contaminé ont également permis de constater que la croissance des larves est un paramètre de mesure biologiquement significatif, sensible, et que la seule survie ne permet pas de décrire fidèlement les effets potentiels à long terme de la toxicité du sédiment (Call *et al.*, 1993b ; USEPA, 1994a). Par exemple des essais d'une durée de 10 jours au cours desquels on a exposé des larves de *C. tentans* à des échantillons de sédiment des Grands Lacs ont montré que plusieurs échantillons avaient provoqué des retards de la croissance, même si la survie n'était pas diminuée (Call *et al.*, 1993b). Une série d'essais comparatifs de mesure de la croissance et du cycle biologique de *C. tentans*, par Liber *et al.* (1996), a montré qu'un retard de croissance de 35 à 50 % chez les larves, au bout de 10 jours, se traduisait par une réduction semblable du taux de sortie des adultes.

Plusieurs études ont porté sur la sensibilité relative des larves de chironomidés à des produits chimiques précis, à l'eau de porosité ou à un sédiment contaminé. Dans des essais comparatifs n'employant que de l'eau et utilisant un certain nombre d'espèces d'invertébrés dulcicoles, y compris des amphipodes, la sensibilité des larves de *C. riparius* a parfois été considérée comme faible (Green *et al.*, 1985 ; Williams *et al.*, 1985) ou intermédiaire (Green *et al.*, 1986 ; Williams *et al.*, 1986a ; Brown et Pascoe, 1988). Cependant, ces essais avaient employé des larves de chironomidés des troisième et quatrième stades. Des essais

comparatifs d'exposition, sur de courtes et de longues périodes, de larves de chironomidés du premier ou du deuxième stade de *C. tentans* ou de *C. riparius* à de l'eau seulement ont montré qu'elles étaient souvent au moins aussi sensibles que les daphnés ou les amphipodes (Cairns *et al.*, 1984 ; Ingersoll *et al.*, 1990 ; Schubauer-Bergigan et Ankley, 1991 ; Taylor *et al.*, 1991a ; Suedel *et al.*, 1993a ; Phipps *et al.*, 1995). Les essais de mesure de la survie ou de la croissance et de la survie après exposition prolongée ($\geq$ 10 j) à des échantillons de sédiment contaminé, prélevés sur le terrain ou de sédiment enrichi ont également révélé que les larves de *C. tentans* ou de *C. riparius* du premier ou du deuxième stade pouvaient être au moins aussi sensibles que les daphnés (*Daphnia magna*) ou les amphipodes (*Hyalella azteca*), selon la nature des échantillons comparés (Ingersoll et Nelson, 1990 ; Othoudt *et al.*, 1991 ; West *et al.*, 1993 ; USEPA, 1994a). Dans les publications techniques, on ne trouve aucune comparaison de la sensibilité des larves de *C. tentans* et des larves de *C. riparius* aux sédiments ou à l'eau contaminée.

Organismes d'essai

2.1 Espèces et stade

Dans la présente méthode, il faut utiliser les espèces *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera : Chironomidae) ou *Chironomus riparius* Meigen. Leur identification devrait être confirmée et étayée par des experts en la matière à l'aide des caractéristiques taxonomiques décrites et illustrées dans les annexes F (*C. tentans*) et G (*C. riparius*).

Les tests de mesure de la toxicité des sédiments que nous décrivons doivent débuter avec soit le troisième stade larvaire de *C. tentans* ou le premier de *C. riparius* (v. § 4.1, note 24). Les organismes devraient être élevés en laboratoire à 23 ± 1 °C (v. § 2.3.5). Norberg-King (1994) a constaté que la capsule céphalique mesurait en moyenne 0,38 mm de largeur (fourchette de 0,33 à 0,45 mm) chez les larves du troisième stade de *C. tentans*, dont l'âge après l'éclosion variait de 9 à 13 j à la température de 23 °C. Les larves du premier stade de *C. riparius* élevées à 23 °C avaient une capsule céphalique d'une largeur de 0,1 mm (fourchette de 0,09 à 0,12 mm) environ en moyenne, et leur âge variait normalement de 0 à 3 j après l'éclosion (Day *et al.*, 1994 ; K. Day, données inédites).

2.2 Origine et acclimatation

Tous les chironomes utilisés dans un essai doivent provenir de la même population. Les géniteurs dont on a besoin pour établir des élevages (v. § 2.3) peuvent provenir de laboratoires de l'État ou de laboratoires privés, qui élèvent des larves de *C. tentans* ou de *C. riparius* en vue d'essais toxicologiques appliqués aux sédiments. Ils peuvent également provenir du commerce [7]. On peut obtenir des géniteurs des fournisseurs canadiens suivants :

Chironomus tentans

Aquatic Toxicity Section
Standards Development Branch
Ministry of Environment and Energy
125 Resources Road
Etobicoke (Ont.) M9P 3V6

Section de la toxicologie aquatique
Centre de la science environnementale du Pacifique
Environnement Canada
2645, route Dollarton
North Vancouver (C.-B.) V7H 1V2

Chironomus riparius

Laboratoire de toxicologie
Section de la qualité de l'environnement
Centre des sciences de l'environnement
Environnement Canada
C.P. 23 005
Moncton (N.-B.) E1A 6S8

7. Des chercheurs pourraient s'inquiéter des effets d'une consanguinité excessive dans les élevages de laboratoire ou souhaiter utiliser la progéniture d'organismes d'une station particulière. On peut donc établir des élevages à partir de populations sauvages. Dans ce cas, il faudrait en confirmer la taxonomie, les élever pendant plusieurs générations et en évaluer la sensibilité à un ou à des toxiques de référence avant d'en utiliser la progéniture dans des essais toxicologiques. On devrait éviter de se procurer des populations sauvages en vue d'essais, à moins d'avoir démontré qu'elles peuvent se croiser avec des populations existantes de laboratoire (USEPA, 1994a).

Pour obtenir des adresses de fournisseurs américains de *C. tentans*, consulter USEPA (1994a ; tableau 10.1).

Les futurs reproducteurs qui serviront à établir des élevages de *C. tentans* ou de *C. riparius* se transportent le mieux quand ils sont à l'état de masses d'œufs venant d'être pondues. On devrait transporter vers le laboratoire un nombre convenable de masses d'œufs (p. ex. au moins 5) dans l'eau dans laquelle elles ont été pondues. Cette eau devrait être bien oxygénée (saturée à 90 à 100 %) avant l'expédition. On devrait isoler les récipients afin de réduire au minimum les variations de température au cours du transport. On devrait assurer une livraison rapide des organismes vivants (c'est-à-dire dans les 24 h). Les récipients ne seront pas surpeuplés, afin de réduire au minimum le stress et de prévenir le déficit d'oxygène au cours du transport.

À l'arrivée des masses d'œufs au laboratoire, on devrait les conserver dans l'eau dans laquelle elles ont été transportées, pendant qu'on en règle la température, ou les transférer dans une eau bien oxygénée, réglée à la température de l'eau du récipient d'expédition. On recommande d'exposer graduellement les organismes à l'eau dans laquelle on les élèvera, dans les cas où sa qualité (p. ex. dureté, pH, conductivité) présente un saut marqué. On pourrait également suivre les conseils sur l'acclimatation des organismes à l'eau d'essai (§ 4.1), quand on transférera les organismes d'une autre source à l'eau d'élevage.

On devrait régler l'eau à la température désignée d'élevage (23 °C [§ 2.3]), graduellement, sans dépasser 2 °C/j (USEPA, 1994a). Durant l'acclimatation, on devrait aérer modérément l'eau qui a servi à garder les géniteurs. Pendant cette période intérimaire d'acclimatation des géniteurs aux conditions de laboratoire, les autres paramètres devraient être aussi semblables que possible à ceux dont on s'est servi pour maintenir les élevages (§ 2.3).

2.3 Élevage

2.3.1 Généralités

Le présent paragraphe renferme des conseils et des recommandations généraux pour l'élevage de *C. tentans* ou de *C. riparius* en vue de la mesure de la toxicité des sédiments. Sachant que ce qui fonctionne bien dans un laboratoire risque de décevoir dans un autre laboratoire (USEPA, 1994a), on laisse beaucoup de détails précis de l'élevage, notamment le choix de l'enceinte d'élevage, du nombre d'organismes par enceinte, des conditions de renouvellement de l'eau, du substrat fourni aux larves et de la ration alimentaire, à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire, bien que l'on fournisse des orientations et des recommandations.

Pour décider si les organismes conviennent aux essais et si les résultats des essais sont acceptables, on se sert de critères de performances[8]. Pour convenir aux essais, les élevages doivent être frappés d'un faible taux de mortalité, les organismes doivent sembler en bonne santé et se comporter normalement pour la quête de nourriture et d'autres activités. Il faudrait également démontrer l'acceptabilité de l'élevage par des essais parallèles ou permanents à l'aide d'au moins

---

8. Les critères de performances comprennent : la survie et l'état des organismes d'élevage destinés à l'essai (§ 2.3.11) ; les conditions de validation de l'essai par les organismes témoins (§ 4.2) ; le comportement de groupes d'organismes dans des essais toxicologiques de référence (§ 4.8).

un toxique de référence (§ 4.8). On devrait écarter tout lot d'organismes qui ne satisfait pas à ces critères.

Il revient au laboratoire de démontrer sa capacité d'obtenir des résultats constants, précis, à l'aide d'au moins un toxique de référence, lorsqu'il se prépare à des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de *C. tentans* ou de *C. riparius*. À cette fin, il devrait déterminer sa précision intralaboratoire, qu'exprime le coefficient de variation des CL50, par au moins cinq essais, chaque fois avec différents lots d'organismes de même origine, le même toxique de référence, un mode opératoire et des conditions identiques (v. § 4.8) [USEPA, 1994a]. Il devrait aussi confirmer la précision actuelle de ses essais, par au moins cinq essais de survie et de croissance de différents lots d'organismes, d'une durée de 10 j, dans des sédiments témoins (USEPA, 1994a). Les conditions et les modes opératoires de ces essais initiaux devraient être identiques et conformes aux exigences de la section 4.

Dans un programme de mesures courantes de la toxicité des sédiments à l'aide de larves de chironomidés, il faudrait mensuellement effectuer des essais de référence à l'aide des organismes élevés dans le laboratoire, en se conformant aux conditions et aux modes opératoires énoncés au § 4.8. Sinon, on devrait, au moyen d'un essai parallèle, évaluer la performance de sujets provenant de l'élevage utilisé pour mesurer la toxicité d'un sédiment. En outre, on devrait vérifier à l'aide d'un essai toxicologique de référence les performances de tout élevage venant d'être établi à l'aide de nouveaux géniteurs (§ 2.2), et les résultats devraient se révéler acceptables (v. § 2.3.11 et 4.8), avant d'en utiliser les sujets.

On devrait fréquemment et assidûment observer les élevages (p. ex. journellement ou, au moins, trois fois par semaine), en notant le nombre de masses d'œufs utilisées pour entreprendre chaque élevage, les dates de renouvellement des élevages, le moment de la première émergence et le nombre estimatif d'adultes qui émergent, le calendrier et la grosseur des repas, l'origine de l'eau d'élevage ainsi que la méthode et le débit de son renouvellement, les mesures de la qualité de l'eau, etc. (v. section 7, « Rapports à produire »).

L'annexe C résume les conditions et modes opératoires de l'élevage des chironomes dans les laboratoires de l'État. Ces détails qui, on le présume, ont donné de bons résultats constituent des indications utiles, sauf mention du contraire. Le tableau 1 est une liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage de larves de *C. tentans* et de *C. riparius*, dont la descendance servira aux essais de mesure de la toxicité des sédiments.

2.3.2 Installations et appareillage

On doit élever les chironomes en installation thermostatée de laboratoire. L'équipement servant à régler la température (incubateur, bain d'eau à recirculation ou enceinte thermostatée) doit la maintenir dans les limites exigées (§ 2.3.5). On doit isoler l'animalerie du local de préparation ou d'entreposage des échantillons ou du laboratoire afin d'éviter la contamination provenant de ces locaux. La conception et la construction de l'animalerie doivent prévenir la contamination des élevages (p. ex. absence de conduites ou de garnitures de cuivre ou de métal galvanisé d'où pourraient dégoutter des condensats contaminés par ces métaux).

Tableau 1. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage des larves de chironomes destinés aux essais de mesure de la toxicité des sédiments

Origine des chironomidés	—	Élevages commerciaux, laboratoires de l'État ou laboratoires privés ; tous les sujets utilisés dans un essai ont la même origine ; confirmation des espèces.
Acclimatation	—	Graduelle (≤ 2 °C/j) pour ce qui concerne les écarts de température à l'arrivée.
Origine de l'eau	—	Eau souterraine, eau de surface, eau reconstituée, non contaminée ou, au besoin, eau déchlorée du robinet.
Qualité de l'eau	—	Surveillance journalière de la température ; surveillance au moins hebdomadaire de l'OD ; mesure du pH, de la dureté et/ou de l'alcalinité et de la teneur en ammoniaque durant les 24 h précédant le début de l'essai.
Enceinte d'élevage	—	Diverses possibilités (v. annexe C.2).
Nombre d'organismes au début de l'essai	—	Divers ; on recommande de 150 à 200 larves de *C. tentans* du premier stade ou 250 à 500 larves de *C. riparius*, par enceinte d'élevage de 20 L.
Renouvellement de l'eau	—	Périodique ou continu ; il est recommandé d'ajouter au moins 1 volume/jour (minimum : 25 à 30 % par semaine), à moins que l'eau ne soit recyclée par un filtre convenable (voir note 11).
Température	—	23 ± 1 °C, moyenne journalière, et 23 ± 3 °C, mesure instantanée.
Aération / oxygénation	—	Aération modérée ; maintenir le taux d'OD à ≥ 80 % de la concentration de saturation.
Éclairage	—	500 à 1 000 lux immédiatement à la surface de l'eau ; tubes (fluorescents ou l'équivalent) placés au-dessus de l'enceinte, débitant un large spectre continu de longueur d'ondes) ; photopériode de 16 h.
Substrat	—	Sable de silice ou pâte de serviettes de papier non blanchi déchiquetées ; épaisseur recommandée : 1 cm.
Alimentation	—	Flocons moulus pour poissons tropicaux (p. ex. Tetrafin[MC] ou Nutrafin[MC]) ; on autorise diverses quantités et fréquences ; ration journalière recommandée : 300 mg, poids sec, par enceinte d'élevage de 20 L.
Âge requis pour l'essai	—	Troisième stade larvaire de *C. tentans* ; premier stade larvaire de *C. riparius*.

On devrait concevoir l'aération pour empêcher l'entrée ou la reprise d'air provenant du local des expériences ou de toute autre partie du laboratoire où des contaminants sont présents.

Tout l'équipement, tous les récipients et tous les accessoires risquant d'entrer en contact avec les organismes ou l'eau du local d'élevage (animalerie) doivent être propres, convenablement rincés et être construits de matériaux non toxiques (p. ex. verre, Téflon[MC], acier inoxydable de nuance 316, nylon, Nalgene[MC], porcelaine, polyéthylène, polypropylène, fibre de verre). Les matériaux toxiques (cuivre, zinc, laiton, métal galvanisé, plomb et caoutchouc naturel, notamment) ne doivent pas entrer en contact avec l'appareillage et l'équipement ni avec l'eau des élevages. On devrait filtrer au besoin l'air comprimé alimentant directement l'animalerie pour s'assurer qu'il est exempt d'huile et d'émanations.

2.3.3 Éclairage

Il devrait être vertical, en spectre continu (fluorescents ou l'équivalent). La photopériode devrait être fixée à 16 h. L'intensité lumineuse à proximité de la surface de l'eau des enceintes devrait varier de 500 à 1 000 lux (USEPA, 1994a).

2.3.4 Eau d'élevage

L'eau servant à l'élevage de *C. tentans* ou de *C. riparius* peut provenir d'une source souterraine, d'une nappe de surface ou d'eau reconstituée, non contaminées. On peut également la préparer par dilution d'eau naturelle avec une eau distillée ou désionisée très pure, jusqu'à ce que l'on obtienne le degré de dureté recherché. Pour être acceptable, elle doit permettre une survie, une croissance et un développement satisfaisants des organismes.

Dans certaines études localisées dans l'espace, le plan d'expérience pourrait exiger une eau prélevée au même endroit que les échantillons. Si on utilise cette eau ou une eau de surface, on devrait la passer au tamis fin (p. ex. à mailles de 30 µm) pour en éliminer les prédateurs ou les concurrents potentiels. On peut stériliser l'eau qui pourrait être contaminée par des pathogènes en la faisant traverser un stérilisateur aux ultraviolets.

En général, on ne recommande pas l'eau déchlorée pour l'élevage ou les essais. De qualité souvent variable, elle pourrait renfermer des concentrations inacceptables de chlore, de chloramines, de fluorures, de cuivre, de plomb, de zinc ou d'autres contaminants. Toutefois, des laboratoires utilisent couramment, sans problème apparent, l'eau déchlorée du robinet pour l'élevage des chironomes et comme eau d'essai. Si on utilise de l'eau potable du réseau municipal, sa déchloration[9] doit, de fait, la débarrasser du chlore ou des chloramines[10] résiduels.

---

9. L'aération vigoureuse peut volatiliser une partie du chlore résiduel. Ensuite, la filtration sur charbon actif (charbon d'os), puis, peut-être, l'exposition aux UV (Armstrong et Scott, 1974) suppriment la plus grande partie des chloramines et des autres organochlorés résiduels. Le séjour de l'eau dans un bassin de garde aéré pendant 1 ou 2 j pourrait procurer un avantage supplémentaire.

10. La teneur en chlore résiduel total recommandée pour la protection des organismes dulcicoles, est d'au plus 0,002 mg/L (CCREM, 1987). Au-dessus, se pose le risque d'interaction entre la toxicité du chlore et des chloramines et celle des contaminants faisant l'objet de l'essai. La limite de détection du chlore ou des chloramines résiduels dans l'eau déchlorée d'alimentation doit être suffisamment basse pour qu'on soit sûr que la teneur en chlore résiduel est d'au plus 0,002 mg/L.

Si on élève *C. tentans* ou *C. riparius* dans de l'eau douce reconstituée, qui sert également aux essais, la recette du laboratoire de l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA) à Cincinnati (Ohio) pourrait se révéler utile. La recette donnée ci-dessous, qui donne une eau d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ par litre, provient d'USEPA (1994a). La proportion des chlorures aux sulfates y est plus grande que dans les autres recettes fréquemment utilisées (p. ex. USEPA, 1985a et b, 1991b, 1993 ; EC, 1992b). La recette s'est révélée convenir à l'élevage de chironomes et aux essais avec ces organismes (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a). Afin de préparer 100 L d'eau douce reconstituée, utiliser des produits chimiques de qualité « réactif » (sels anhydres), comme suit (USEPA, 1994a) :

1. Verser environ 75 L d'eau désionisée très pure dans un récipient propre (v. § 3.1).
2. Ajouter 5 g de sulfate de calcium ($CaSO_4$) et 5 g de chlorure de calcium ($CaCl_2$) à une partie aliquote de 2 L d'eau désionisée, puis mélanger (p. ex. agitateur à barreau magnétique) pendant 30 min ou jusqu'à dissolution des sels.
3. Ajouter 3 g de sulfate de magnésium ($MgSO_4$), 9,6 g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et 0,4 g de chlorure de potassium (KCl) à une deuxième partie aliquote de 2 L d'eau désionisée et mélanger à l'agitateur à barreau magnétique pendant 30 min.
4. Verser les deux parties aliquotes de 2 L renfermant les sels en dissolution dans les 75 L d'eau désionisée et ajuster le volume de liquide dans la tourie à 100 L avec de l'eau désionisée.
5. Aérer le mélange au moins 24 h avant de l'utiliser.
6. La qualité de l'eau reconstituée devrait être approximativement comme suit : dureté de 90 à 100 mg/L en tant que carbonate de calcium ($CaCO_3$) ; alcalinité de 50 à 70 mg/L en tant que $CaCO_3$; conductivité de 330 à 360 µS/cm ; pH de 7,8 à 8,2.

On devrait aérer l'eau reconstituée avant de l'utiliser, afin d'en régler la concentration d'OD dans un intervalle acceptable (v. § 2.3.6) et d'en stabiliser le pH. On devrait mesurer la conductivité, le pH, la dureté, la teneur en OD et l'alcalinité de chaque lot d'eau reconstituée (USEPA, 1994a). L'USEPA (1991b) recommande d'utiliser le lot d'eau reconstituée deux semaines, mais pas plus de quatre semaines.

Les caractéristiques de l'eau d'élevage des chironomes devraient être assez uniformes, afin d'augmenter la probabilité de réussite de l'élevage dans le laboratoire et de réduire au minimum les variations des conditions de vie et de développement des organismes. Selon l'USEPA (1994a), la qualité de l'eau naturelle est considérée comme uniforme si la dureté, l'alcalinité et la conductance spécifiques s'écartent, mensuellement, de moins de 10 % de leur moyenne et si, mensuellement, le pH varie de moins de 0,4.

On devrait enregistrer systématiquement la qualité de l'eau dans les enceintes d'élevage ; vérifier journellement la température et au moins hebdomadairement la teneur en OD ; mesurer, aussi souvent que c'est nécessaire pour déterminer la qualité de l'eau, sa dureté, son alcalinité, son pH et sa teneur en ammoniaque. On recommande la mesure de ces variables au moins trimestriellement et la veille d'un essai (USEPA, 1994a).

On devrait doser les nitrites, les matières en suspension (MES), les gaz totaux en

dissolution, les métaux, les pesticides et tout autre contaminant préoccupant, aussi souvent que cela convient (p. ex. trimestriellement ou plus souvent) dans l'eau d'élevage des chironomes. La limite de détection de chaque méthode d'analyse devrait être largement inférieure (c'est-à-dire de 3 à 10 fois) soit à la concentration dans l'eau, soit à la plus faible concentration qui s'est révélée nocive pour la survie, la croissance ou le développement des chironomes ou de tout autre animal dulcicole sensible (EC, 1992c).

On devrait renouveler systématiquement l'eau des enceintes d'élevage [11], manuellement ou automatiquement, grâce à l'appareillage et aux techniques convenables pour le renouvellement continu ou périodique de l'eau. L'USEPA (1994a) recommande un débit équivalant à au moins un volume par jour, bien qu'il semble inutile d'y aller à cette intensité. Le minimum admissible est l'addition de 25 à 30 % du volume par semaine (NWRI, 1992) à moins que l'eau ne soit recyclée au travers de filtres du commerce (fournitures d'aquariophiles).

2.3.5 Température

La température moyenne journalière de l'eau dans les enceintes d'élevage de *C. tentans* ou de *C. riparius* devrait être de 23 ± 1 °C (tableau 1). En outre, la température instantanée de l'eau devrait être de 23 ± 3 °C [12].

2.3.6 Oxygène dissous

On devrait aérer vigoureusement l'eau d'élevage immédiatement avant de l'employer, afin d'assurer une teneur en oxygène convenable et d'empêcher sa sursaturation en gaz. On devrait alors doser l'OD afin de confirmer que sa teneur est satisfaisante (p. ex. 90 à 100 % de la teneur de saturation).

On devrait aérer modérément les élevages à débit lent ou modéré (annexe C.4) au moyen d'air comprimé exempt d'huile et filtré. On devrait utiliser comme conduites d'aération des tubes jetables et des pipettes de verre ou de plastique à usage unique ou, dans les gros élevages, des pierres poreuses (fournitures d'aquariophiles). Pour s'assurer que l'OD est suffisant pour une survie et une croissance optimales des organismes, il est recommandé de le maintenir à 80 à 100 % de la teneur de saturation.

2.3.7 Substrat

Différents types de substrats ont donné de bons résultats pour l'élevage de *C. tentans* ou de *C. riparius* (v. annexe C.5) ; le choix est laissé à la discrétion et à l'expérience du

---

11. Les filtres d'aquarium du commerce peuvent assurer en continu une bonne qualité de l'eau (G.A. Burton fils, université d'État Wright, Dayton (OH), comm. privée, 1994). Ils peuvent remplacer le système de renouvellement de l'eau ou servir en appoint.

12. Certains organismes favorisent une température quelque peu inférieure (p. ex. 20 ± 1 °C, moyenne journalière et 20 ± 3 °C, température instantanée) pour l'élevage des larves de chironomidés et pour les essais de mesure de la toxicité des sédiments par la survie et la croissance (v. annexes C et D). On peut élever et éprouver les larves de chironomidés dans cette fourchette quelque peu inférieure (c'est-à-dire de 20 à 22 °C), à la condition que : (i) la gamme des températures d'élevage et des températures des essais d'un groupe donné d'organismes soit essentiellement la même ; (ii) la température moyenne journalière ne fluctue pas de plus ± 1 °C ; (iii) la température instantanée ne fluctue pas de plus de ± 3 °C ; (iv) tout écart par rapport à la fourchette des températures que nous recommandons soit décelé et signalé. Il faut savoir que le développement ou la croissance des larves peuvent être quelque peu moindres qu'à 23 °C.

personnel de laboratoire. On recommande pour les larves de chironomidés l'emploi de sable de silice propre (lavé) ou de la pâte lavée obtenue par déchiquetage de serviettes de papier non blanchi (Ingersoll et Nelson, 1990 ; ASTM, 1991a, 1994, 1995a ; Bedard *et al.*, 1992 ; NWRI, 1992 ; BBA/IVA, 1994 ; USEPA, 1994a). Le papier filtre Whatman n° 1 donne également une pâte normalisée qui convient comme substrat d'élevage (D. Pascoe, Collège de l'Université de Galles, Cardiff, communication privée, 1994). On recommande pour les enceintes d'élevage une épaisseur de 1 cm de substrat.

2.3.8 Alimentation

Pour l'élevage des chironomes, on a utilisé divers aliments et régimes alimentaires (v. annexe C.6). On a réussi à élever les larves de chironomidés à l'aide d'un régime à une seule ration de flocons pour poissons tropicaux du commerce, comme le Tetrafin[MC] ou le Nutrafin[MC] (NWRI, 1992 ; OME, 1992 ; Call *et al.*, 1993a ; Ankley *et al.*, 1993 ; USEPA, 1994a ; Milani *et al.*, 1996) [13]. L'emploi de ces flocons ou d'autres flocons du commerce pour poissons, p. ex. les régimes à base de TetraMin[MC], est recommandé pour l'élevage des larves de chironomidés et comme nourriture au cours des essais (§ 4.4). Le choix des quantités d'aliment du commerce à ajouter à chaque enceinte et la fréquence des repas sont laissés à la discrétion et à l'expérience du personnel du laboratoire. Si on a entrepris les élevages dans les aquariums de 20 L, avec 150 à 200 larves du premier stade de *C. tentans* ou avec 250 à 500 larves du premier stade de *C. riparius* par aquarium, nous recommandons de leur donner journellement 300 mg (poids sec) de flocons moulus (tableau 1). Les laboratoires qui renouvellent l'eau par intermittence ou peu souvent (c'est-à-dire moins d'un volume par jour) pourraient utiliser une quantité moindre de nourriture, une quantité propre au système qu'ils utilisent. Dans le § 4.4, nous donnons des instructions sur la préparation et l'entreposage de la nourriture.

2.3.9 Manipulation des organismes

Il faudrait manipuler le moins possible les larves de chironomidés. Si cela est indispensable, y aller doucement, prudemment et rapidement afin de les stresser le moins possible. On peut transférer chaque larve d'un récipient à l'autre à l'aide d'une pipette de verre ou de plastique transparent à extrémité polie et à ouverture de 5 ou 6 mm de diamètre. On devrait relâcher les organismes ainsi transférés sous l'eau. On ne doit pas utiliser en vue des essais les sujets que l'on laisse tomber, que l'on blesse, qui entrent en contact avec des surfaces sèches ou qui semblent traumatisés.

2.3.10 Établissement et entretien des élevages

Divers choix sont possibles concernant le type, la taille et la densité de peuplement des enceintes d'élevage (v. annexe C.2), le type d'eau et sa méthode de renouvellement (annexe C.3), le substrat (annexe C.5) et la fréquence des repas au cours de l'élevage (annexe C.6). Nous laissons le choix de tous ces paramètres en grande partie à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire ; cependant, les méthodes d'élevage doivent produire suffisamment de larves de chironomidés pour que l'on entreprenne les essais toxicologiques prévus

---

13. On conseille de moudre à fond les flocons afin de prévenir la formation d'un feutrage de champignons sur le substrat sableux des enceintes d'élevage (K. Liver, université du Wisconsin, Superior [WI], communication privée, 1994).

avec le sédiment et/ou le ou les toxiques de référence. En outre, les organismes élevés doivent satisfaire à des critères précis de performance (v. § 2.3.11, 4.2 et 4.8).

Pour entreprendre un nouvel élevage, on devrait conserver à 23 °C, dans un becher ou un récipient de verre ou de plastique non toxique (§ 2.3.2) contenant 100 à 150 mL d'eau d'élevage, un nombre suffisant (au moins cinq, normalement) de masses d'œufs venant d'être pondues, provenant d'une source de l'extérieur (§ 2.2) ou d'un autre élevage du laboratoire. On devrait examiner périodiquement les masses d'œufs pour déterminer la réussite de l'éclosion. Dès que les embryons commencent à sortir (en environ deux à quatre jours après la ponte), il est recommandé d'ajouter à l'eau un peu (p. ex. 4 mg de Tetrafin[MC] ou de Nutrafin[MC]) d'aliment en suspension. Quand la plupart des larves sont sorties des masses d'œufs, on devrait en transvaser dans l'enceinte d'élevage un nombre convenable (p. ex. de 150 à 200 *C. tentans* ou de 250 à 500 *C. riparius* ; tableau 1) du premier stade. On devrait faire les observations et l'inscription systématique des données (§ 2.3.1), la surveillance de la qualité de l'eau (§ 2.3.4) et la distribution de nourriture (§ 2.3.8) durant le maintien de l'élevage.

On devrait remplacer régulièrement l'eau de chaque enceinte d'élevage (§ 2.3.4). On devrait augmenter le débit du renouvellement de l'eau (ou réduire la densité des larves) si ces dernières semblent traumatisées ou si l'eau est trouble (USEPA, 1994a). Si, à cette fin, on utilise une méthode manuelle, on devrait veiller à ne pas retirer ou à ne pas aspirer de larves durant l'opération. On peut utiliser une petite crépine ou un filet fin pour attraper ou retenir les larves montant en surface. On peut, au cours de l'opération de renouvellement, essuyer les parois de l'enceinte ou les récurer. Toute l'eau de renouvellement doit être réglée à la température de l'élevage (23 °C) et elle doit subir une aération vigoureuse pour en assurer la saturation en oxygène, avant son introduction dans l'enceinte.

À 23 °C, l'émergence des adultes débutera deux (*C. riparius*) ou trois semaines (*C. tentans*) après la ponte. Chaque jour, on peut aspirer avec douceur les adultes en les récupérant dans une bouteille à dépression sèche (p. ex. fiole conique de 250 ou de 500 mL (USEPA, 1994a). On évitera les coups secs pour l'aspiration, afin de ne pas blesser les adultes. On devrait vérifier l'indice de masculinité chez les adultes pour assurer la présence d'un taux suffisant (p. ex. $\geq$ 50 %) de géniteurs mâles (USEPA, 1994a).

On devrait préparer une enceinte pour l'accouplement et la ponte. On trouvera dans USEPA (1994a) des conseils utiles sur l'appareillage qui convient. Le choix des enceintes est facultatif et il est laissé à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire.

2.3.11 Critères de santé

On devrait vérifier l'état de santé des élevages au moins trois fois par semaine (p. ex. le lundi, le mercredi, le vendredi), de préférence, journellement. On devrait enregistrer, dans un dessein de contrôle, les performances de chaque élevage (v. § 2.3.1, 2.3.4, 4.2 et 4.8). On devrait systématiquement évaluer les méthodes de conservation de chaque élevage et les corriger, au besoin, afin d'en assurer ou d'en restaurer le bon état de santé. Les sujets qui semblent morts ou qui sont inactifs lorsqu'on les pousse doucement ne doivent pas servir aux essais.

Les essais permettant de mesurer la toxicité de référence devrait avoir lieu mensuellement, avec l'élevage ou les élevages de larves de chironomidés, dans les conditions et au moyen des modes opératoires exposés dans le § 4.8. On peut également effectuer ce type d'essai en même temps que l'essai de mesure de la toxicité des sédiments. Dans les § 4.2 et 4.8, on énonce les critères dont on se sert pour juger de la santé et de la sensibilité de l'élevage pour les besoins des essais.

Des dosages biochimiques, par exemple du taux de lipides chez les larves d'élevage, pourraient livrer des renseignements utiles sur la santé des élevages (USEPA, 1994a). On pourrait mettre au point d'autres critères d'évaluation de la santé, notamment le poids sec moyen minimal des chironomes à un âge ou à un stade larvaire donnés. Les poids légers pourraient signifier un élevage exposé à des conditions de croissance qui n'étaient pas optimales. Des enregistrements permanents de ces indices et d'autres de l'état de santé des élevages se révéleront sans doute utiles. Ne pas hésiter à les prendre en note. On n'a pas encore mis au point de critères sanitaires précis à l'égard des mesures physiologiques, bien que cela puisse se faire à l'avenir.

Système expérimental

3.1 Installations et appareillage

L'essai peut se dérouler dans un bain d'eau, un caisson climatique ou une enceinte équivalente, thermostatée et à éclairage programmé (v. § 3.2). L'installation expérimentale doit maintenir le sédiment et l'eau des enceintes à la température moyenne journalière de 23 ± 1 °C (v. § 4.2). Elle devrait être bien aérée afin de soustraire le personnel aux émanations nocives, être isolée des causes physiques de perturbation ou de tout contaminant nuisible aux organismes. Le local où on prépare les sédiments pour les essais devrait également être bien aéré.

L'installation expérimentale devrait être isolée du local d'élevage des organismes, afin d'éviter la contamination des élevages. En outre, elle ne devrait pas se trouver dans les locaux où on garde ou prépare les échantillons, afin de prévenir tout risque de contamination des enceintes et de leur contenu par ces sources. Le système de ventilation devrait être conçu, inspecté et utilisé de façon à empêcher l'air provenant de l'installation expérimentale de contaminer les locaux d'élevage. L'air de reprise des locaux de manutention et d'entreposage des échantillons ou des locaux de traitement ou de contrôle des produits chimiques ne devrait pas retourner vers la partie du laboratoire servant aux essais. Tout matériau qui pourrait entrer en contact avec les organismes, l'eau ou les enceintes expérimentales de cette installation doit être non toxique (v. § 2.3.2).

L'air comprimé qui y sert à l'aération de l'eau doit être exempt d'huile et de vapeurs. Chaque fois que c'est possible, on devrait utiliser des pompes pneumatiques sans huile. Des filtres en circuit, que l'on remplace au besoin, afin d'en assurer l'efficacité, devraient arrêter toute huile ou toute particule présente dans l'air d'arrivée.

On devrait choisir l'équipement et les fournitures entrant en contact avec l'eau, les sédiments ou les enceintes expérimentales de façon à réduire au minimum la sorption de produits chimiques. On devrait utiliser, toutes les fois que c'est possible, le verre borosilicaté, le nylon, le polyéthylène et le polystyrène haute densité, les polycarbonates, les plastiques fluorocarbonés et l'acier inoxydable 316 pour réduire au minimum la sorption et la lixiviation. On doit éviter d'utiliser les appareils et les fournitures faits de matériaux toxiques (v. § 2.3.2).

Au cours de l'essai, on peut soit renouveler l'eau journellement, soit fonctionner en conditions statiques (v. section 4). Plusieurs modèles d'appareils assurent la distribution et le renouvellement de l'eau surnageante dans les enceintes [14] (p. ex. Maki, 1977 ; Benoit *et al.*, 1993 ; Zumwalt *et al.*, 1994). Conviendrait un appareil qui permet le renouvellement minuté et intermittent de l'eau surnageante dans chaque enceinte, au

14. On peut également remplacer l'eau surnageante manuellement, par siphonnement, ce qui demande plus de main-d'œuvre et remet généralement en suspension plus de sédiments qu'un système automatisé (USEPA, 1994a).

débit de deux additions du volume par jour (USEPA, 1994a). Nous recommandons pour le test le dispositif automatisé conçu par Zumwalt *et al.* (1994), parce qu'il est peu coûteux, qu'il est facile à construire et à étalonner et qu'il débite des volumes d'eau petits et assez constants vers les enceintes. L'USEPA (1994a) donne des conseils utiles sur la conception de ce système et d'autres systèmes automatisés (débitant deux fois le volume de l'enceinte par jour).

Que l'on opte pour les conditions statiques ou pour le renouvellement journalier de l'eau exigeant l'aération de l'eau (v. § 4.3), on a besoin, pour l'aération continue (à faible débit) de chaque enceinte, d'un jeu de pipettes de verre jetables et de tubes d'aération pour aquariums. Pour régulariser le débit de l'air, nous recommandons des robinets multiples en acier inoxydable (plutôt qu'en laiton). En conditions statiques (y compris dans les essais avec un toxique de référence), il faut un approvisionnement de verres de montre de la bonne taille pour couvrir chaque enceinte expérimentale.

L'installation expérimentale doit être dotée des instruments de base exigés pour surveiller la qualité (p. ex. température, pH, OD, conductivité) de l'eau d'essai et de l'eau de porosité. En outre, le laboratoire devrait être équipé des instruments qui facilitent l'analyse rapide et fidèle, dans les limites acceptables de détection, des variables telles que la dureté, l'alcalinité, la teneur en ammoniaque et (si on utilise pour l'élevage ou les expériences l'eau déchlorée de la ville) le chlore résiduel.

Dans toutes les enceintes, l'équipement et les fournitures qui peuvent entrer en contact avec les sédiments ou l'eau doivent être propres et rincés, avant usage, à l'eau d'essai, à l'eau désionisée ou à l'eau distillée. On devrait laver après usage toutes les fournitures non jetables. On recommande la méthode suivante de nettoyage (USEPA, 1994a).

1. Trempage à l'eau du robinet, 15 min ; récurage au détergent ou lavage au lave-vaisselle automatique.
2. Double rinçage à l'eau du robinet.
3. Rinçage soigneux à l'acide nitrique (HNO_3) ou chlorhydrique (HCl) frais, dilué (10 % en volume [15]) afin d'éliminer le tartre, les métaux et les bases.
4. Double rinçage à l'eau désionisée.
5. Rinçage à l'acétone non diluée, de pureté convenant à l'analyse des pesticides, afin de supprimer les composés organiques (travailler sous hotte ouverte ou fermée).
6. Triple rinçage à l'eau désionisée de qualité.

On devrait rincer à fond, avec l'eau d'essai, immédiatement avant de les utiliser dans l'essai, les enceintes expérimentales et l'appareillage susceptibles d'entrer en contact avec les sédiments ou l'eau d'essai.

Avant d'entreprendre des essais toxicologiques dans une nouvelle installation expérimentale, on devrait réaliser au moins cinq essais toxicologiques de référence d'une durée de 96 h, *sur de l'eau seulement*, et au moins cinq essais de mesure de la survie et de la croissance, d'une durée de 10 jours, dans un sédiment témoin, afin de confirmer que les larves de *C. tentans* ou de *C. riparius* peuvent se comporter de façon acceptable dans la nouvelle installation et dans les

15. Pour préparer la solution d'acide à 10 %, ajouter précautionneusement 10 mL d'acide concentré à 90 mL d'eau désionisée.

conditions et les méthodes d'élevage et d'essai que nous énonçons (v. § 2.3.1 et section 4). Dans chaque essai avec toxique de référence ou un sédiment témoin, on devrait employer un lot différent d'organismes obtenus par élevage. On devrait comparer les résultats de ces essais préliminaires en calculant et en estimant le coefficient de variation des séries respectives d'essais et des valeurs des paramètres de mesure.

3.2 Éclairage

L'éclairage de toutes les enceintes devrait être direct et vertical, en spectre continu (p. ex. éclairage fluorescent ou l'équivalent), et être assez intense pour fournir de 500 à 1 000 lux près de la surface de l'eau. Il devrait être aussi uniforme que possible dans toutes les enceintes. On devrait régler la photopériode à 16 h.

3.3 Enceintes expérimentales

On recommande des bechers ou des jarres de verre de forme haute, de 300 mL de contenance et d'un diamètre intérieur d'environ 7 cm (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a) [16]. Il faut nettoyer à fond avant et après usage chaque becher ou jarre (§ 3.1) et bien les rincer, avant usage, à l'eau d'essai. Normalement, les essais avec renouvellement journalier de l'eau n'exigent pas de couvrir les enceintes, contrairement aux essais en conditions statiques. On recommande cependant de les couvrir si le sédiment renferme des concentrations décelables de gaz volatils. Font de bons couvercles les verres de montre propres ou les couvercles de verre ou de plastique.

3.4 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution

Selon ce que sera le plan d'expérience et l'objectif de l'essai (v. sections 5 et 6), on peut prendre comme eau d'essai (c'est-à-dire l'eau recouvrant les sédiments) et comme eau témoin ou de dilution (c'est-à-dire l'eau servant à préparer les solutions filles et l'eau témoin des essais *avec eau seulement* et toxiques de référence) l'eau d'une source non contaminée d'eau douce naturelle ou de l'eau reconstituée. Souvent, la source de l'eau est la même que celle qui a servi à l'élevage des chironomes (v. § 2.3.4), mais elle peut être différente. Par exemple, l'eau trouvée sur place ou de l'eau propre dont on a réglé la dureté à la valeur de celle de l'eau qui se trouve sur les lieux du prélèvement peuvent se révéler un bon choix (v. § 5.4). La qualité de l'eau servant aux expériences et de l'eau témoin ou de dilution est extrêmement importante ; cette eau doit s'être révélée permettre une survie et une croissance acceptables des organismes au cours d'essais d'une durée de 10 j menés avec un sédiment témoin (v. § 4.2) avant de servir aux essais toxicologiques. Dans le § 2.3.4, on trouvera des conseils sur la préparation d'eau douce reconstituée.

---

16. Nous recommandons les enceintes répondant à ces caractéristiques dans le souci de nous conformer à USEPA (1994a) et à ASTM (1995a). Cependant, les études comparatives avec *C. tentans* dans ces enceintes ou des enceintes plus volumineuses (jarres de verre de 1,8 L) n'ont mis en évidence presque aucune différence dans les résultats (Bedard, 1996). On peut opter pour un becher ou une jarre de verre d'une capacité et d'un diamètre différents, à la condition de : (i) noter dans le rapport sur les essais l'écart par rapport aux dimensions recommandées ; (ii) préciser également le type d'enceinte, sa forme et ses dimensions ; (iii) réaliser toutes les répétitions et les variantes de l'essai dans des enceintes identiques.

Il faut au préalable régler l'eau d'essai ainsi que l'eau de contrôle et de dilution à la température des enceintes. Le taux d'OD dans l'eau devrait être de 90 à 100 % de la valeur à saturation à cette température. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume exigé d'eau (à l'aide d'air comprimé, exempt d'huile, traversant des pierres poreuses) immédiatement avant usage, puis vérifier la teneur en OD afin de confirmer qu'elle se trouve à 90 à 100 % de la teneur de saturation. On ne devrait utiliser l'eau que si son pH est stable.

3.5 Sédiment témoin

Chaque essai de mesure de la toxicité des sédiments doit comprendre un témoin expérimental, constitué d'au moins cinq bechers ou jarres renfermant du même sédiment témoin, essentiellement exempt de tout contaminant qui pourrait nuire à la survie, à la croissance ou au comportement de *C. tentans* ou de *C. riparius* au cours de l'essai. Ce sédiment témoin mesure le caractère acceptable de l'essai (la survie moyenne à la fin doit être d'au moins 70 %), il montre que les organismes sont en bonne santé et qu'ils se comportent normalement et il sert de point de comparaison à l'interprétation des résultats obtenus avec les sédiments d'essai.

Le sédiment témoin peut être soit un sédiment prélevé dans la nature, mais à l'écart de sources connues de contaminants, qui s'est déjà révélé autoriser une survie et une croissance acceptables des chironomes dans les conditions expérimentales, soit un sédiment artificiel[17]. Le choix du bon sédiment témoin dépend de considérations telles que le plan d'expérience, les caractéristiques physico-chimiques du ou des sédiments d'essai et la disponibilité d'un sédiment convenable, non contaminé, possédant les propriétés recherchées. Le sédiment devrait également s'être révélé donner des valeurs acceptables et cohérentes pour les paramètres biologiques de mesure, au moyen de *C. tentans* ou de *C. riparius* et de la présente méthode. Si les sédiments naturels non contaminés ont longtemps servi de témoins dans des essais toxicologiques avec des chironomes, les sédiments artificiels sont un gage de constance et d'uniformité plus grandes, que recherchent de nombreux scientifiques (Dwyer *et al.*, 1993 ; Suedel et Rodgers, 1994a et b ; USEPA, 1994a ; Suedel *et al.*, 1996). Il est actuellement prématuré de recommander une recette de sédiment artificiel qui convienne à un essai de mesure *de la survie et de la croissance* en 10 jours à l'aide de larves de chironomidés.

---

17. On dit également *sédiment reconstitué* ou *sédiment synthétique*. On le prépare ordinairement à base de sable, de limon, d'argile et de constituants organiques non toxiques du commerce. On le mouille avec de l'eau reconstituée ou naturelle. On peut imiter différents sédiments naturels quant à la granulométrie, à la teneur en carbone organique, au pH, à la capacité d'échange cationique, etc. (Suedel et Rodgers, 1994a ; Milani *et al.*, 1996). On peut également utiliser au moins une recette pour préparer un ou des sédiments témoins normalisés, que l'on utilisera systématiquement dans le dosage biologique de la toxicité des sédiments d'eau douce au moyen de *C. tentans* ou de *C. riparius* (Suedel *et al.*, 1996).

Modes opératoires universels

Les méthodes et les conditions générales exposées dans les pages qui suivent s'appliquent à chacun des essais toxicologiques décrits pour les échantillons de sédiment, les déchets particulaires et de produits chimiques ainsi qu'aux essais toxicologiques de référence. Dans la section 5, on trouve des méthodes plus spécifiques pour les essais mettant en jeu des échantillons de sédiments ou d'autres matières particulaires semblables (p. ex. boues, stériles miniers essorés, résidus de boues de forage) prélevés sur le terrain. Dans la section 6, nous donnons des orientations et des méthodes particulières pour la réalisation d'essais utilisant des échantillons témoins ou des échantillons enrichis expérimentalement à l'aide d'un ou de plusieurs produits chimiques, sédiments contaminés ou déchets particulaires.

Il faut intégrer dans les modes opératoires universels tous les aspects du système expérimental décrits dans la section 3. La liste sommaire de contrôle des conditions expérimentales et des modes opératoires recommandés du tableau 2 ne décrit pas seulement des modes opératoires universels, mais, également, des modes opératoires permettant de tester des types précis de matières ou de substances.

Tableau 2. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour la mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de chironomes

Essai universel

Type d'essai	— Mesure de la toxicité du sédiment entier, en 10 jours. Deux options : renouvellement journalier de l'eau surnageante ; pas de renouvellement (essai en conditions statiques)
Renouvellement de l'eau	— Si journalier, à raison de deux volumes par jour ; si en conditions statiques, aucun renouvellement durant l'essai, sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation.
Eau (surnageante) d'essai	— Eau d'élevage, eau souterraine ou eau de surface non contaminée ; eau du lieu de prélèvement ; eau dont la dureté a été réglée à celle de l'eau du lieu de prélèvement ; eau douce reconstituée, pour une plus grande uniformisation ; OD à 90 à 100 % de la valeur à saturation dans l'eau surnageante.

Essai universel

Sédiment témoin	— Échantillon de sédiment non contaminé, utilisé pour évaluer les performances des organismes et l'acceptabilité de l'essai ; sédiment naturel ou artificiel.
Organismes d'essai	— Larves de *C. tentans* du troisième stade ou de *C. riparius* du premier stade (≤ 48 h après l'éclosion), au début de l'essai ; 10 par enceinte expérimentale.
Enceinte expérimentale	— Becher ou jarre de verre de forme haute, de 300 mL ; diamètre intérieur d'environ 7 cm ; normalement non couvert, si on renouvelle journellement l'eau ; couvert en conditions statiques.
Volume de sédiment humide	— 100 mL.
Volume de l'eau d'essai	— 175 mL.
Nombre de répétitions	— Recommandé : au moins 5 du terrain, chacune constituée d'un échantillon discret (c'est-à-dire différent) provenant du même lieu emplacement d'échantillonnage ; il doit y avoir au moins 5 répétitions en laboratoire pour chaque répétition provenant du terrain.
Température	— Moyenne journalière, 23 ± 1 °C ; température instantanée, 23 ± 3 °C.
Éclairage	— Éclairage vertical en spectre continu (par fluorescents ou l'équivalent) ; 500 à 1 000 lux ; photopériode de 16 h.
Aération	— Aucune, si renouvellement journalier de l'eau, à moins que la teneur en OD dans l'eau surnageante ne chute sous 40 % de la valeur de saturation ; en conditions statiques, aération continue et minimale (p. ex. 2 à 3 bulles/s), dans chaque enceinte expérimentale.
Alimentation	— Flocons moulus d'aliment pour poissons tropicaux (p. ex. Tetrafin[MC] ou Nutrafin[MC]), distribués journellement, à raison de 6,0 mg de matières sèches dans une suspension de 1,5 mL, par enceinte expérimentale ou quatre fois seulement (en des journées non consécutives), à raison de 15,0 mg de matières sèches dans une suspension de 3,75 mL versée dans chaque enceinte, à chaque repas.
Observations	— Facultatifs : le nombre d'organismes dans chaque enceinte aperçus sur le sédiment, et leur comportement (observations journalières ou moins fréquentes).
Mesures des caractéristiques de l'eau surnageante	— Au moins trois fois par semaine : la teneur en OD et la température dans chaque enceinte ; au début et à la fin de l'essai : le pH et la conductivité et la teneur en ammoniaque, dans chaque enceinte ; recommandées : la dureté et/ou l'alcalinité au début et à la fin.

Essai universel

Paramètres de mesure	— Survie et poids notablement inférieurs à ceux des essais témoins ou de référence (d'après le taux moyen de survie et le poids sec moyen dans chaque enceinte ; CL50 après 10 j d'exposition à une série de concentrations, s'il y a lieu ; CIp du gain de poids, s'il y a lieu.
Validité de l'essai	— Essai invalide si le taux de survie, après 10 j, des organismes exposés au sédiment témoin est inférieur à 70 % ; invalide si le poids sec moyen de la larve des groupes témoins est inférieur, à la fin de l'essai, à 0,6 mg (*C. tentans*) ou à 0,5 mg (*C. riparius*).

Sédiment (ou matière particulaire semblable) prélevé sur le terrain

Transport et entreposage	— Si l'échantillon se trouve à plus de 7 °C, refroidir à cette dernière température (glace ou contenants réfrigérants) ; transport à l'obscurité, entre 1 et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C) ; conservation à l'obscurité à 4 ± 2 °C ; l'essai devrait débuter dans les deux semaines et le doit dans les six semaines.
Sédiment de référence	— Au moins un échantillon pour les essais effectués avec un sédiment prélevé sur le terrain ; l'échantillon de référence est prélevé en des endroits présumés non pollués, mais dans les parages des lieux de prélèvement des sédiments d'essai (c'est-à-dire même étendue d'eau) ; souvent retenu pour l'essai toxicologique en raison de ses similitudes physico-chimiques (p. ex. granulométrie et/ou teneur en carbone organique) avec les sédiments d'essai.
Caractérisation de l'échantillon	— Au moins l'analyse granulométrique (pourcentage de sable, de limon et d'argile), du carbone organique total, du pourcentage d'eau, ainsi que du pH et de la teneur en ammoniaque de l'eau de porosité.
Préparation de l'échantillon	— Uniquement s'il le faut, enlever les débris et les macro-organismes indigènes à l'aide de pincettes ; homogénéiser l'échantillon (y compris tout liquide surnageant) avant de l'utiliser dans l'essai ; au besoin, le débarrasser des petits macro-organismes, par passage au tamis fin (p. ex. 0,25 à 0,5 mm) par pression mécanique ou par lavage au liquide qui s'est séparé de l'échantillon au cours du transport et de l'entreposage, puis mêler de nouveau ce liquide avec l'échantillon tamisé.

Échantillon enrichi

Caractérisation de l'ajout ou des ajouts	— Information exigée sur la stabilité, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la pureté et la biodégradabilité des substances chimiques ajoutées au sédiment témoin.
Solvant	— L'eau d'essai est le solvant à préférer ; si on utilise un solvant organique, l'essai doit comprendre un témoin du solvant.

Échantillon enrichi

Préparation des mélanges	—	Le mode opératoire dépend du plan et des objectifs de l'expérience ; il pourrait comprendre une ou plusieurs concentrations de produit(s) chimique(s) mélangé(s) dans le sédiment témoin ou le sédiment d'essai ou des concentrations d'un produit donné ajouté à l'eau d'essai recouvrant le sédiment témoin ; on peut préparer les mélanges de produits chimiques et de sédiment sous forme de suspension, soit à la main, soit par agitation mécanique.
Concentration de l'ajout ou des ajouts	—	Normalement mesurée au début et à la fin de l'essai, en trois titres : élevé, moyen et faible.
Eau d'essai et de dilution	—	Utiliser de l'eau reconstituée si on exige un degré poussé d'uniformité.

Nous décrivons les modes opératoires universels de l'essai de mesure de la toxicité des sédiments, d'une durée de 10 jours, qui comprend les deux options suivantes [18] :

(1) renouvellement journalier de l'eau surnageante au rythme de deux volumes par jour, normalement sans aération ;

(2) conditions statiques, où l'eau surnageante n'est pas renouvelée, mais est aérée.

Quelle que soit l'option, on nourrit les larves avec des flocons moulus de nourriture pour poissons tropicaux, soit à raison d'un repas quotidien de 6,0 mg de matières sèches, soit quatre fois seulement (en des journées non consécutives, avec 15,0 mg de matières sèches par repas (v. § 4.4). Les paramètres biologiques de mesure sont la survie et le poids sec à la fin de l'essai.

4.1 Début de l'essai

Chaque enceinte (v. § 3.3) de l'installation

18. Les essais en conditions statiques et les essais avec renouvellement périodique de l'eau semblent donner des résultats semblables, si on se conforme aux présents modes opératoires. On a comparé les deux régimes, par des essais parallèles sur des échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou enrichis de contaminants. (Milani *et al.*, 1996). Les résultats d'essais interlaboratoires avec *C. riparius* portent à croire que les conditions statiques donnent lieu à quelque peu moins de variabilité que le renouvellement périodique de l'eau. Les coefficients de variation (CV) interlaboratoires de la moyenne générale (de tous les laboratoires) du taux de survie après 10 jours dans les échantillons de sédiment prélevés sur le terrain variaient de 2,1 à 5,5 %, en conditions statiques, et de 7,5 à 17,0 %, en régime de renouvellement périodique, tandis que les CV de la moyenne générale du poids des larves au bout de 10 jours dans les mêmes échantillons ont varié respectivement de 2,6 à 4,4 % et de 29,2 à 56,2 %.

Dans les essais effectués par chaque laboratoire au moyen d'une gamme de concentrations de sédiments enrichis de cuivre, les CV de la moyenne générale du taux de survie ont respectivement varié de 2,1 à 25,1 % et de 2,6 à 56,3 % ; les CV du poids des larves ont varié respectivement de 7,7 à 27,4 %, et de 29,2 à 75,9 %. La comparaison statistique des CL50 après 10 jours et des CI25 déterminées grâce à ces concentrations multiples de cuivre ne permettent pas de distinguer un écart constant dans la sensibilité des essais menés sous un régime ou sous l'autre (Milani *et al.*, 1996).

expérimentale doit être clairement codée ou étiquetée afin de reconnaître l'échantillon ou sa concentration. Il faut enregistrer la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes ou sur des feuilles séparées, portant exclusivement sur l'essai. On devrait disposer les enceintes de façon à faciliter les observations et les mesures. Les variantes devraient être réparties au hasard dans l'installation (USEPA, 1994a).

La journée de la première exposition des larves aux échantillons de matière ou de substance d'essai est désignée jour 0. La veille (c'est-à-dire au jour –1), on devrait mélanger à fond [19] (v. § 5.3 et 6.2) chaque échantillon ou sous-échantillon de sédiment ou de matière particulaire d'essai, y compris de sédiment témoin et de sédiment de référence, jusqu'à homogénéisation de la couleur, de la texture et de la teneur en eau. Le contrôle quantitatif de l'homogénéité pourrait porter sur la répartition granulométrique, le carbone organique total, le taux d'humidité et comprendre le dosage de certaines molécules.

Immédiatement après le mélange, on devrait transvaser dans les enceintes des volumes répétés de 100 mL de l'échantillon [20]. Il faut établir au moins cinq répétitions de laboratoire par variante (v. § 5.1 et 6.2) [21]. On devrait lisser le sédiment versé dans chaque enceinte à l'aide d'une spatule ou en frappant doucement la paroi du tranchant de la main. On verse ensuite l'eau d'essai (v. § 3.4) doucement le long de la paroi du becher ou de la jarre. Afin de perturber le moins possible le sédiment, on peut appliquer à sa surface, avant de verser l'eau, un disque de Téflon[MC], de polyéthylène ou de nylon, découpé aux dimensions intérieures du becher (EC, 1992a) [22].

Si, au cours de l'essai, on renouvelle journellement l'eau surnageante, on devrait ajouter alors dans l'enceinte 175 mL d'eau d'essai (ou de solution d'essai, selon la nature de l'essai) en tout ; on peut se faire une idée du volume ajouté par une marque indiquant 275 mL sur la paroi. En vue des essais en conditions statiques, on peut

---

19. On doit remêler à l'échantillon tout liquide qui s'en est séparé pendant le transport ou l'entreposage.

20. Il est recommandé d'ajouter dans chaque enceinte de 300 mL de capacité, 100 mL de sédiment et 175 mL d'eau d'essai (USEPA [1994a] et ASTM [1995a]). Ainsi, le ratio eau/sédiment, de 1,75/1, est beaucoup plus faible que ceux de 4/1 ou de 5/1 qu'emploient certains chercheurs (v. annexe D). Selon certains faits (Bedard, 1996), ce ratio pourrait ne pas être une variable critique de l'uniformisation de la méthode ; mais serait-ce toujours vrai ? On peut choisir un type différent d'enceinte (v. note 16) ou modifier le ratio eau/sédiment de 1,75/1 que nous recommandons, à la condition de : (i) toujours utiliser, dans un essai donné, des volumes identiques d'eau et de sédiment dans chaque enceinte ; (ii) noter ces volumes dans le rapport de l'expérience ainsi que le ratio eau/sédiment résultant ; (iii) noter en sus les écarts par rapport aux volumes que nous recommandons pour l'eau et le sédiment et par rapport au ratio résultant eau/sédiment que nous recommandons.

21. L'USEPA (1994a) exige au moins quatre répétitions par variante et en recommande huit par variante pour les essais mesurant la toxicité d'un sédiment.

22. En y attachant une longueur suffisante de monofilament de nylon (ou d'un matériau équivalent non toxique), on facilite la récupération du disque. On peut aussi découper le disque dans un sac de polyéthylène, en lui donnant la forme d'un « trou de serrure ». La « patte » attachée au cercle permet sa récupération. On devrait rincer le disque avec de l'eau d'essai, si on le réutilise dans des répétitions d'une variante. Pour chaque variante, on devrait utiliser un disque distinct.

d'abord ajouter un volume quelque peu moindre (p. ex. 125 à 145 mL), pour disposer d'un certain volume de réserve pour l'addition d'eau au moment où on ajoutera les organismes.

Si on renouvelle journellement l'eau surnageante de chaque enceinte, on devrait le faire la veille (jour – 1) de l'essai, puis durant ce dernier, à raison de deux volumes par jour (USEPA, 1994a ; tableau 2)[23], en évitant un débit supérieur afin de prévenir l'entraînement et la baisse de concentration inutiles des contaminants du sédiment par leur lixiviation dans l'eau surnageante. Cette dernière n'est normalement pas aérée, et on couvre les enceintes. On recommande d'employer un dispositif automatisé de renouvellement intermittent, comme celui de Benoit *et al.* (1993) et qu'ont modifié Zumwalt *et al.* (1994) [v. § 3.1] ; on peut le régler pour renouveler l'eau surnageante à des intervalles de 12 h. Si on utilise un système automatisé, on devrait l'étalonner avant d'entreprendre l'essai, afin d'en vérifier le comportement ; entre deux enceintes, le débit ne devrait pas différer de plus de 10 % en aucun moment au cours de l'essai (USEPA, 1994a ; ASTM, 1994a). Si on renouvelle l'eau surnageante deux fois par jour par siphonnement, on devrait veiller à ne pas perturber le sédiment ou à ne pas perdre accidentellement de sujets d'expérience qui seraient sortis du sédiment au cours de l'opération. On ne devrait pas siphonner et remplacer plus de 90 % de l'eau, et l'extrémité du tube ne doit pas toucher le sédiment.

Si l'essai se passe en conditions statiques, il faudrait aérer l'eau de chaque enceinte durant la nuit avant d'y introduire les organismes et poursuivre l'aération durant l'essai (v. § 4.3). On devrait couvrir chaque becher ou jarre (d'un verre de montre ou d'un couvercle de plastique) avant et durant l'essai, afin de réduire au minimum l'évaporation de l'eau ainsi que la possibilité de contamination. On devrait remplacer au point médian de l'essai (ou plus souvent, si on le veut ou si c'est nécessaire) toute eau perdue par évaporation, en ajoutant doucement de l'eau d'essai, qu'on laissera couler le long de la paroi de l'enceinte. On aura réglé la température de cette eau. Sur la paroi, une marque indiquant 275 mL pourra aider à évaluer le volume à ajouter.

Les organismes d'essai proviennent d'élevages de laboratoire (c'est-à-dire de masses d'œufs pondues par des adultes d'élevage, en préparation de l'essai ; v. § 2.3.10). Au début de l'essai, les larves de *C. tentans* doivent être au troisième stade

---

23. Dans les essais avec renouvellement (jusqu'à quatre par jour) de l'eau surnageante, les caractéristiques de la qualité de l'eau restent généralement semblables à celles de l'eau fournie. Toutefois, en l'absence de mesure de la toxicité des sédiments dans les essais sans renouvellement ou avec moins d'un renouvellement par jour, la qualité (p. ex. conductivité, alcalinité, dureté) peut varier fortement. Ainsi, la valeur de ces trois paramètres ou la teneur en produits du métabolisme (p. ex. l'ammoniaque) pourraient augmenter (Ingersoll et Nelson, 1990 ; Ankley *et al.*, 1993a ; USEPA, 1994a), en étant susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai. On peut éviter ces variations par le renouvellement systématique (c'est-à-dire deux fois par jour) de l'eau surnageante tout au long de l'essai. En dépit de cela, des chercheurs préfèrent les en conditions statiques, moins exigeantes en main-d'œuvre et en équipement, de crainte que le renouvellement journalier (ou deux fois par jour) de l'eau ne détoxifie graduellement le sédiment et n'en atténue les effets toxiques potentiels (Milani *et al.*, 1996).

et celles de *C. riparius* au premier stade[24]. Si on utilise *C. tentans*, il faut mesurer la largeur de la capsule céphalique (au moyen d'un microscope à dissection à micromètre oculaire) d'au moins 20 larves choisies au hasard parmi les organismes prélevés dans l'élevage au jour 0 en vue de l'essai, afin d'en confirmer le stade larvaire. Il est alors souhaitable aussi d'en mesurer alors le poids sec ou la longueur (USEPA, 1994a). Si on utilise *C. riparius*, les larves doivent être du premier stade, mais sans dépasser l'âge de 48 h. Il n'est pas nécessaire d'en mesurer la largeur de la capsule céphalique, puisque, à cet âge, ces larves sont sûrement du premier stade. Le tableau 3 donne des indications sur les intervalles d'âge et de largeur de la capsule céphalique des différents stades larvaires de *C. tentans* ou de *C. riparius*.

Souvent, mais pas obligatoirement, l'eau d'élevage servira à recouvrir les sédiments au cours de l'essai. En raison de ses objectifs, un essai donné peut exiger de l'eau d'une autre origine (p. ex. l'eau de l'endroit à l'étude). Si, pour l'essai, on se sert d'une autre eau que l'eau d'élevage, il n'est pas nécessaire d'y acclimater les organismes (USEPA, 1994a), bien que cela puisse être à conseiller, afin de réduire au minimum le stress causé par une eau aux caractéristiques différentes. S'il faut acclimater les organismes, il est utile de les garder 2 h dans un mélange 50/50 d'eau d'élevage et d'eau d'essai, puis 2 h dans un mélange 25/75, enfin 2 h dans une eau 0/100, avant de les introduire dans les enceintes expérimentales (Ingersoll et Nelson, 1990). Cette acclimatation devrait se faire au jour – 1.

Au jour 0, on répartit au hasard 10 larves par enceinte. On devrait les manipuler le moins possible et le plus précautionneusement possible au cours du transfert (v. § 2.3.9). Il faut les déposer dans l'eau. On peut les transférer directement, à la pipette, de leur enceinte d'élevage à l'eau surnageante (Ankley *et al.*, 1993). On peut également compter 10 larves en les transvasant dans une enceinte de transfert (p. ex. un gobelet de plastique de 30 mL) remplie de l'eau d'essai à la température d'essai également, puis on les recompte avant de les transférer dans l'eau surnageante (Ingersoll et Nelson, 1990 ; USEPA, 1994a). Cette dernière façon de faire est particulièrement utile, puisqu'elle permet de compter deux fois les organismes avant de les transférer dans l'enceinte expérimentale. Toute larve qui continue d'adhérer à la paroi de l'enceinte de transfert doit être entraînée avec précaution dans l'eau surnageante de l'enceinte expérimentale à l'aide d'une pipette Pasteur et d'une quantité minimale d'eau d'essai réglée à la température de l'essai. Après le transfert, on devrait augmenter au besoin le volume de l'eau surnageante jusqu'à la marque de 275 mL inscrite sur la paroi de l'enceinte.

4.2 Conditions expérimentales

- L'essai mesure la toxicité d'un sédiment complet. Selon le cas : (1) on ne renouvelle pas l'eau surnageante sauf ajout périodique (p. ex. au jour 7) du

---

24. *C. tentans* doit être au troisième stade ou être plus jeune au début de l'essai, la moitié des organismes au moins étant au troisième stade, selon la coutume de l'USEPA (1994a) et de l'ASTM (1995a). Il faut utiliser des larves du premier stade dans les essais de mesure de la toxicité du sédiment d'une durée de 10 jours avec *C. riparius*, au développement plus rapide que celui de *C. tentans*. À 23 °C, l'adulte de *C. riparius* peut sortir dès le 15e ou 16e jour, selon le sexe (Day *et al.*, 1994), ce qui est trop tôt pour un essai de 10 jours, à moins d'entreprendre l'essai avec des larves du premier stade.

Tableau 3. — Âge et largeur de la capsule céphalique de larves de *Chironomus tentans*[25] et de *Chironomus riparius* élevées à 23 °C[26]

Espèce	Stade larvaire	Nbre de jours après l'éclosion	Largeur de la capsule céphalique (mm)	
			Moyenne	Fourchette
C. tentans	1er	1,0 à 4,4	0,10	0,09 à 0,13
C. tentans	2e	4,4 à 8,5	0,20	0,18 à 0,23
C. tentans	3e	8,5 à 12,5	0,38	0,33 à 0,45
C. tentans	4e	> 12,5	0,67	0,63 à 0,71
C. riparius	1er	0 à 3[27]	0,10	0,07 à 0,12
C. riparius	2e	4 à 6	0,19	0,13 à 0,24
C. riparius	3e	7 à 14	0,33	0,26 à 0,40
C. riparius	4e	> 8	0,55	0,43 à 0,60

25. Paramètres déterminés par Norberg-King (1994) et cités dans USEPA (1994a).

26. RIZA (1993) et Day *et al.* (1994), ainsi que des données inédites de K.E. Day et ses collaborateurs (Direction de la conservation des écosystèmes aquatiques, Institut national de recherche sur les eaux, Environnement Canada, Burlington [Ont.]).

27. La plupart des larves auront accédé au second stade le quatrième jour après l'éclosion.

volume nécessaire d'eau d'essai pour compenser les pertes dues à l'évaporation (c'est-à-dire essai en conditions statiques) ; (2) on renouvelle l'eau surnageante tout au long de l'essai, à raison de deux volumes par jour (essai avec renouvellement journalier de l'eau).

- L'essai dure 10 jours.
- Il doit se dérouler à la température moyenne journalière (de l'eau surnageante) de 23 ± 1 °C. En outre, la température instantanée doit se trouver dans l'intervalle de 23 ± 3 °C (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a)[28].
- Le récipient recommandé pour l'essai est un becher ou une jarre de verre de forme haute de 300 mL, dont le diamètre intérieur est d'environ 7 cm.
- Les sédiments témoins et d'essai devraient former une couche uniforme de 100 mL, recouverte de 175 mL d'eau.
- Si on renouvelle journellement l'eau, on ne couvre normalement pas les enceintes, mais on peut utiliser des couvercles pour réduire au minimum la perte de substances volatiles des sédiments ou pour réduire le risque de contamination. On n'aère normalement pas l'eau surnageante, à moins que la teneur en OD ne chute sous 40 % de la valeur de saturation au cours de l'essai (v. § 4.3). Dans chaque enceinte, les organismes doivent être nourris, soit quatre fois au cours de l'essai (en des journées non consécutives), soit journellement (v. § 4.4).
- En conditions statiques, on devrait couvrir les enceintes. On devrait aérer continuellement l'eau surnageante à un débit minimal (v. § 4.3). On doit nourrir les organismes, soit quatre fois durant l'essai (en des journées non consécutives), soit journellement (v. § 4.4).
- Les enceintes bénéficient d'une photopériode de 16 h, fournie par un éclairage vertical, en spectre continu (fluorescents ou l'équivalent). L'intensité de la lumière près de la surface de l'eau devrait être de 500 à 1 000 lux.
- Pour que l'essai soit valide, le taux moyen de survie des larves de chironomidés dans le sédiment témoin doit être d'au moins 70 % à la fin de l'essai. En outre, le poids sec minimal de chaque larve dans les groupes témoins des répétitions doit être en moyenne d'au moins 0,6 mg à la fin de l'essai (jour 10), si on utilise *C. tentans* (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a) ou d'au moins 0,5 mg, si on utilise *C. riparius*[29].

---

28. Dans certaines publications des provinces (Bedard *et al.*, 1992) ou d'autres modes opératoires (p. ex. RIZA, 1992 et BBA/IVA, 1994), on indique une température quelque peu plus basse ou plus variable. Cela n'est pas incompatible avec notre mode opératoire, à la condition que le rapport de l'essai expose clairement cet écart (v. section 7). Qu'on sache cependant qu'une basse température pourrait retarder l'atteinte du poids sec moyen minimal chez les organismes témoins, à la fin de l'essai. Or, ce minimum précisé à l'égard de chaque espèce de chironomidés est l'une des conditions de validité de l'essai.

29. Au vu des données sur le poids sec de groupes témoins de *C. riparius*, après 10 jours d'exposition à des conditions statiques ou au renouvellement intermittent de l'eau (que nous définissons dans le présent rapport), Milani *et al.* (1996) concluent que le critère de validité d'au moins 0,5 mg par organisme serait normalement réaliste et sensé pour cette espèce. Ils recommandent donc ce critère, quelle que soit l'option retenue.

4.3 Oxygène dissous et aération

Les larves de chironomidés peuvent survivre à l'hypoxie, bien que leur survie ou leur croissance puissent être diminuées si la teneur en OD reste longtemps inférieure à 25 à 35 % (USEPA, 1991a) [§ 1.4]. Quand on renouvelle journellement l'eau surnageante, il est habituellement inutile d'aérer cette dernière. La concentration d'OD n'y descendra pas sous 40 % de la concentration de saturation, grâce au renouvellement, à moins que le sédiment utilisé n'exerce une demande exceptionnelle en oxygène. Si, au cours de l'essai avec renouvellement journalier de l'eau, le taux d'OD descend sous 40 % ou excède 100 % du taux de saturation dans au moins une des enceintes, on devrait aérer l'eau surnageante de toutes les enceintes, y compris des enceintes témoins, afin de maintenir la concentration d'OD entre 40 et 100 % de saturation. Si on doit aérer l'eau surnageante, on devrait distribuer dans chaque enceinte de l'air comprimé exempt d'huile, au moyen d'une conduite et d'un tube de plastique ou de verre jetables (p. ex. tube capillaire ou pipette munie d'un cône Eppendorf) à petite ouverture (p. ex. 0,5 mm, d.i.). Pour la régularisation du débit de l'air, il est utile de disposer de robinets multiples en acier inoxydable. L'extrémité du tube d'où sort l'air devrait être suspendue à environ 3 cm au-dessus du sédiment. L'aération de chaque enceinte doit être lente (p. ex. 2 à 3 bulles/s) et elle ne doit pas perturber la surface du sédiment (Zumwalt *et al.*, 1994). Il faut signaler dans les rapports ou procès-verbaux de l'expérience toute opération d'aération du milieu exécutée pendant l'essai (section 7).

En conditions statiques, on devrait aérer en continu l'eau surnageante de chaque enceinte, à compter de la nuit précédant le début de l'essai (v. § 4.1) de même que durant l'essai. L'air comprimé, déjà filtré de façon à être exempt d'huile, devrait barboter en passant par une pipette de verre jetable. L'extrémité de la pipette devrait être suspendue à environ 3 cm au-dessus du sédiment. L'aération de chaque enceinte doit être lente (p. ex. 2 à 3 bulles/s). On devrait vérifier systématiquement le débit de l'air vers chaque enceinte (p. ex. journellement) durant l'essai et effectuer les réglages nécessaires pour qu'il reste lent.

4.4 Nourriture et alimentation

Quelle que soit l'option retenue pour l'essai, on doit nourrir les organismes, soit une fois par jour, soit quatre fois (en des journées non consécutives) durant l'essai. Comme le poids sec des animaux est un paramètre important de mesure, il faut distribuer dans chaque enceinte, à chaque repas une ration identique. Cette ration doit permettre un taux de survie et une croissance acceptables de *C. tentans* ou de *C. riparius* durant l'essai (v. § 4.2), sans être trop généreuse [30].

Si on choisit de nourrir les organismes journellement, on doit ajouter à l'eau de chaque enceinte expérimentale, journellement à compter du jour 0, jusqu'à la fin de l'essai, 6,0 mg (poids sec) de flocons moulus d'aliment pour poissons tropicaux (p. ex. Tetrafin^MC ou Nutrafin^MC) sous forme d'inoculum de 1,5 mL d'une suspension de

---

30. L'alimentation est essentielle pour assurer un taux de survie convenable (d'au moins 70 %) et de croissance acceptable aux organismes (Ankley *et al.*, 1993 et 1994 ; Milani *et al.*, 1996). Il faut éviter une nourriture trop généreuse ou hétéroclite, ce qui pourrait modifier la biodisponibilité des contaminants du sédiment ou favoriser la croissance de champignons microscopiques ou de bactéries à sa surface (USEPA, 1994a).

4,0 mg d'aliment sec par millilitre. Si on choisit de donner quatre repas seulement au cours de l'essai, on doit ajouter 15,0 mg (poids sec) de flocons moulus d'aliment pour poissons tropicaux sous la forme de 3,75 mL d'inoculum d'une suspension de 4,0 mg d'aliment sec par millilitre dans chaque enceinte, à compter du jour 0, ainsi que trois autres fois en des journées non consécutives au cours de l'essai[31] jusqu'à la fin. Les deux régimes procurent globalement la même quantité de nourriture, c'est-à-dire 60,0 mg d'aliment sec par enceinte au cours des 10 jours de l'essai. Le repas quotidien est préférable, parce qu'il permet de répartir également la nourriture disponible, bien que quatre repas par semaine puissent être le choix retenu afin de réduire au minimum le travail de fin de semaine (Milani *et al.*, 1996).

Un régime à une seule ration de flocons moulus d'aliment pour le poisson vendu dans le commerce s'est révélé permettre un bon taux de survie et une bonne croissance de *C. tentans* ou de *C. riparius* au cours des essais d'une durée de 10 jours (NWRI, 1992 ; OME, 1992 ; Ankley *et al.*, 1993 ; Call *et al.*, 1993a, USEPA, 1994a ; Milani *et al.*, 1996). Facile à préparer, ce régime fournit une valeur nutritive assez constante aux larves. L'USEPA (1994a) recommande une ration journalière de 6,0 mg (de matières sèches) de Tetrafin, pour les essais de mesure de la survie et de la croissance de *C. tentans* d'une durée de 10 jours, et cette ration ou la même ration de Nutrafin convient aussi aux essais de la même durée employant *C. riparius* (Melani *et al.*, 1996).

On peut préparer une suspension mère d'aliment, que l'on pourra utiliser au cours de l'essai en écrasant (au pilon, dans un mortier) des flocons d'aliment commercial pour poissons (p. ex. Tetrafin et Nutrafin), en passant le tout au tamis (p. ex. un filet de Nitex[MC] n° 110 ou à mailles de 500 μm) et en mélangeant la mouture avec de l'eau désionisée, pendant une à trois minutes (NWRI, 1991 ; USEPA, 1994a). On peut recueillir la suspension dans des bouteilles de plastique de 100 à 500 mL, à capsule vissante, pour la conserver. On devrait réfrigérer chaque lot et on peut l'utiliser jusqu'à deux semaines (USEPA, 1994a). Avant d'en prélever des parties aliquotes, on devrait mélanger à fond la suspension.

À chaque repas, on devrait prendre des notes détaillées sur le type d'aliment et la ration distribuée dans chaque enceinte. On devrait alors noter également l'aspect du sédiment en surface (c'est-à-dire les signes d'une croissance bactérienne ou fongique). Si, dans au moins une enceinte recevant une nourriture quotidienne, la concentration d'OD chute sous 40 % de saturation, il faudrait suspendre temporairement l'alimentation dans toutes les enceintes, le temps qu'il faudra pour que la teneur en oxygène revienne dans la fourchette acceptable (USEPA, 1994a).

---

31. Par exemple, si les enceintes reçoivent le sédiment et l'eau le lundi, puis les organismes le lendemain, on pourrait nourrir ces derniers le mardi et le vendredi de cette première semaine, puis le lundi et le mercredi de la semaine suivante, l'essai se terminant le vendredi. Des essais comparatifs parallèles pendant lesquels on a donné à *C. riparius* une ration globalement équivalente (c'est-à-dire 60,0 mg d'aliments par enceinte, pendant 10 jours), soit journellement, à raison de 6,0 mg (poids sec) ou quatre fois seulement, à raison de 15,0 mg (poids sec) par repas, ont prouvé que ces régimes différents n'influaient pas sur la survie ou la croissance des organismes, tant en conditions statiques qu'avec renouvellement périodique de l'eau (Milani *et al.*, 1996).

4.5 Observations et mesures au cours de l'essai

Si, ayant choisi de renouveler journellement l'eau, on utilise un système automatisé (v. § 3.1 et 4.1), il faudrait en contrôler le fonctionnement chaque jour. Tout problème de réglage du débit ou tout débordement des enceintes en raison de l'obturation des crépines des conduites d'évacuation devrait entraîner une intervention immédiate (nettoyage, etc.).

Selon les objectifs qu'on s'est donnés à l'étude ou la clarté de l'eau surnageante des enceintes expérimentales, il peut valoir la peine de vérifier régulièrement chaque enceinte, journellement (ou moins souvent), pour observer et enregistrer le nombre de larves de chironomidés visibles à la surface du sédiment. Il faut savoir que ces observations, qui visent à mettre en évidence des réactions d'évitement des organismes, sont parfois difficiles sinon impossibles à réaliser en raison du trouble de l'eau.

Il faut mesurer la température de l'eau surnageante au début de l'essai et, par la suite, au moins trois fois par semaine, au cours de journées non consécutives (p. ex. le lundi, le mercredi, le vendredi) jusqu'à la fin de l'essai. Ces mesures doivent se faire dans au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'expérience ; nous recommandons une fréquence plus grande (c'est-à-dire journalière). En outre, nous recommandons d'enregistrer en continu la température d'un bain d'eau quelconque et/ou la température de l'air dans une pièce ou une enceinte d'essai à température contrôlée.

On doit doser au début de l'essai et, par la suite, au moins trois fois par semaine, au cours de journées non consécutives (p. ex. le lundi, le mercredi et le vendredi), jusqu'à la fin de l'essai l'OD de l'eau surnageante d'au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'expérience. Des mesures plus fréquentes (p. ex. journalières ; ASTM, 1995a), qui seraient justifiées pour les sédiments exerçant une forte demande en oxygène, pourraient être indiquées. Nous recommandons alors l'emploi d'une sonde et d'un oxymètre étalonné. On doit examiner soigneusement la sonde après chaque lecture, pour s'assurer qu'aucun organisme n'y adhère, et il faut la rincer à l'eau désionisée ou distillée avant de la plonger dans un autre échantillon afin de réduire au minimum le risque de contamination croisée. Si les enceintes sont aérées au cours de l'essai (§ 4.3), il faudrait vérifier fréquemment et systématiquement la position de l'extrémité de la pipette dans chaque enceinte et le débit de l'aération et effectuer les corrections nécessaires.

Il faut mesurer, au début et à la fin de l'essai, la conductivité et le pH et doser l'ammoniaque dans au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'essai. En outre, on devrait mesurer la dureté et/ou l'alcalinité de l'eau surnageante, au début et à la fin de l'essai, dans au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'essai (USEPA, 1994a). Pour chaque concentration d'ammoniaque (v. APHA *et al.*, 1995), il faudrait calculer celle de l'ammoniac non ionisé, en tenant compte des valeurs concomitantes du pH et de la température de l'eau surnageante (Trussell, 1972 ; USEPA, 1985c).

On peut mesurer la conductivité et le pH à l'aide de sondes et d'appareils étalonnés. On peut doser l'ammoniaque au moyen d'une électrode spécifique à l'ion ou par prélèvement d'une partie aliquote de l'eau

surnageante, pour l'analyser. On doit faire comme avec la sonde à OD : soigneusement examiner la sonde immédiatement après chaque lecture et la rincer à l'eau désionisée avant de la plonger dans une autre enceinte. Pour les mesures de la dureté et de l'alcalinité et pour le dosage de l'ammoniaque, qui exigent des parties aliquotes d'échantillon d'eau surnageante, on devrait prélever l'échantillon immédiatement avant l'introduction des organismes et à la fin de l'essai. Il pourrait être nécessaire de réunir les échantillons d'eau de chaque répétition de l'essai. Pour ces mesures, on ne devrait pas prélever plus de 10 % du volume de l'eau surnageante d'une enceinte (c'est-à-dire pas plus de 17,5 mL). On devrait utiliser une pipette, pour prélever soigneusement l'eau à la profondeur de 1 à 2 cm au-dessus du sédiment [32]. On devrait vérifier la pipette pour s'assurer qu'on n'a aspiré aucune larve de chironomidé au cours du prélèvement.

Les déterminations de la qualité de l'eau, au début et à la fin de chaque variante d'un essai, sont utiles, puisqu'elles donnent une indication de l'influence du sédiment sur la qualité de l'eau qui le recouvre. Si, dans une variante, on constate une variation marquée (p. ex. de plus de 50 % ; USEPA, 1994a) d'au moins un paramètre de qualité, entre les mesures initiale et finale, on recommande de vérifier les conditions qui ont existé au cours de l'essai et le mode opératoire utilisé (p. ex. le rythme de renouvellement de l'eau surnageante, si l'essai comportait cette opération journalière) et d'examiner soigneusement les caractéristiques physico-chimiques du sédiment utilisé.

32. Il pourrait être nécessaire de réunir des échantillons d'eau de chaque répétition.

4.6 Fin de l'essai

L'essai prend fin après 10 j. Immédiatement avant de tamiser le contenu de l'enceinte, on devrait, à l'aide d'une pipette, en récupérer tous les chironomidés vivants ou apparemment morts qui se trouvent dans l'eau ou à la surface du sédiment. On devrait garder les animaux complètement inactifs, sans, de toute évidence, être morts (p. ex. ils ne sont pas en état de décomposition) dans une boîte de Petri ou tout autre récipient convenable, rempli d'eau d'essai. On doit les examiner de près, sous microscope de faible puissance ou à la loupe. On devrait les pousser doucement du bout d'une pointe fine pour confirmer qu'ils ne présentent aucun signe de vie, auquel cas on devrait les compter comme morts.

On devrait noter le nombre de morts et de survivants. On devrait jeter les cadavres et déposer tous les vivants dans une nacelle numérotée ou tout autre petit récipient permettant de les garder. Le récipient devrait renfermer assez d'eau d'essai, pour rincer les larves et les garder un peu de temps jusqu'à l'arrivée des survivants récupérés par tamisage du sédiment de l'enceinte, qu'on rincera dans la même eau.

Le tamisage puis l'examen du contenu de chaque enceinte pour en récupérer les organismes vivants ou morts devraient prendre le même temps d'une enceinte à l'autre. Pour s'assurer que l'on s'y prend de la bonne façon, nous recommandons que les préposés au tamisage aient montré leur capacité de retrouver dans le sédiment au moins 90 % de chironomes de taille semblable dans le sédiment [33].

33. L'USEPA (1994a) recommande de vérifier la capacité de récupération des organismes par la méthode de Tomasovic *et al.* (1995) : on ajoute les

Nous recommandons la technique suivante, tirée d'USEPA (1994a), pour tamiser le contenu de chaque enceinte. On peut se servir d'autres techniques ou de tamis d'un maillage différent (p. ex. 250 µm, pour *C. riparius* et peut-être aussi pour *C. tentans*), à la condition que, lors d'essais préliminaires, ils se soient révélés permettre la récupération des organismes.

(1) Passer la moitié de l'eau surnageante au tamis n° 50 (à mailles de 300 µm) U.S. Standard.

(2) Faire tourbillonner ce qui reste d'eau pour mettre en suspension le centimètre supérieur de sédiment. Passer la suspension au tamis n° 50. À l'aide d'eau d'essai, entraîner le refus du tamis dans un bassin ou un bac blanc d'inspection.

(3) À l'aide d'une pissette remplie d'eau d'essai, rincer les grosses particules de sédiment subsistant dans l'enceinte en leur faisant traverser un tamis n° 40 (à mailles de 425 µm) et, avec la même eau, entraîner le refus du tamis dans un deuxième bac ou bassin d'inspection.

Avant de faire sécher les organismes en vue de leur pesée, il est recommandé de mesurer la largeur de la capsule céphalique de chaque larve survivante retirée de chaque becher, sous le microscope de dissection à micromètre oculaire. On peut ainsi évaluer le stade larvaire atteint au cours de l'exposition de 10 jours [34].

On compte tous les animaux vivants récupérés de l'eau surnageante ou du sédiment de l'enceinte expérimentale, puis on les réunit dans une nacelle à peser numérotée ou un petit récipient semblable et on les rince à l'eau d'essai afin de déloger tout sédiment adhérant à l'animal. Le rinçage devrait être bref et ne pas survenir plus de 10 min après l'introduction du premier animal. Après le rinçage, on devrait transférer le groupe de larves de chironomidés survivantes dans une nacelle propre, en aluminium, qui aura été numérotée, tarée et conservée au dessiccateur [35].

On porte les nacelles à l'étuve et on laisse sécher 24 h à 60 °C (NWRI, 1992). Chaque nacelle renferme le groupe de larves survivantes retrouvé dans chaque enceinte (répétition). Au sortir de l'étuve, on porte sans tarder les nacelles au dessiccateur. Après refroidissement, on devrait retirer chaque nacelle du dessiccateur et la peser immédiatement [36] à la dizaine de microgrammes près, sur une balance fidèle jusqu'à cette limite de pesée. On calcule

---

organismes au sédiment témoin et on en détermine la récupération après une heure à l'aide de la technique utilisée pour tamiser le contenu des enceintes expérimentales, à la fin de l'essai.

34. Dans certaines conditions de toxicité, on signale le retard du développement larvaire (Powlesland et George, 1986 ; Pascoe *et al.*, 1990). La mesure de la capsule céphalique permet d'évaluer l'existence d'un effet sublétal sur le développement larvaire attribuable à l'exposition au sédiment et elle permet aussi d'évaluer si les poids inférieurs observés au jour 10 correspondent à un ralentissement du développement larvaire (Day *et al.*, 1994).

35. Conseil : faire sécher les nacelles à l'étuve, au moins 48 h, jusqu'à poids constant, puisque les dépôts cireux associés aux nacelles pourraient provoquer des erreurs de pesée (G. Ankley, USEPA, Duluth (MN), communication privée, 1994).

36. Les organismes séchés pouvant absorber rapidement la vapeur d'eau, la pesée de chaque nacelle doit être rapide et d'une durée uniforme. En même temps, des précautions sont nécessaires, parce qu'on risque de perdre des spécimens, en raison de la précipitation des gestes et de l'électricité statique.

pour chaque groupe la masse sèche moyenne de chaque organisme ayant survécu à tout l'essai[37] (v. § 4.7).

Au cours de ces manipulations, on devrait reporter au dessiccateur la première nacelle pesée, pour la repeser à la fin des pesées ; on vérifie ainsi le gain d'eau par les autres nacelles qui se trouvaient au dessiccateur. Le gain de poids ne devrait pas excéder 5 %, sinon il faudrait faire sécher de nouveau toutes les nacelles pendant au moins 2 h, puis les repeser. On devrait tarer quelques nacelles, les sécher et les peser à vide. Les résultats devraient se conformer aux normes de maîtrise de la qualité du laboratoire.

4.7 Paramètres de mesure et calculs

Les paramètres de mesure biologiques de cet essai de détermination de la toxicité des sédiments d'une durée de 10 j sont la survie et le poids sec. On évalue le taux réduit de survie et le retard pondéral par rapport à des groupes de référence ou des groupes témoins (v. § 5.6 et 6.5). On retient, comme indication définitive de la toxicité, le plus sensible de ces deux effets.

À la fin des 10 journées d'exposition, on note sur chaque répétition, y compris chez les groupes témoins, le nombre de larves vivantes et le nombre de mortes. Les manquantes, qu'on suppose être mortes et s'être désintégrées au cours de l'essai, sont comptées comme mortes. On mesure le poids total des groupes de survivantes de chaque répétition.

Pour chaque variante, il faut calculer les deux paramètres suivants :

- Le pourcentage moyen (± un écart-type) d'organismes ayant survécu à l'exposition.
- Le poids sec moyen (± un écart-type) par larve survivante, d'après le poids total du groupe de survivantes.

---

37. La longueur du corps de chaque organisme survivant à la fin de l'essai a été un autre moyen de mesurer la croissance au bout d'essais de détermination de la toxicité d'un sédiment à l'aide de larves de chironomidés (v. annexe D.10). Nous recommandons le poids sec comme indicateur de la croissance. La mesure du poids frais de chaque organisme pourrait également être utile, plus particulièrement aux essais comportant des analyses organoleptiques pour déceler la présence de contaminant (Bedard *et al.*, 1992 ; Bedard, 1996) ; les essais comportant des mesures du poids frais exigent des groupes témoins supplémentaires, afin de déterminer si on satisfait au critère de validité des essais fondé sur le poids sec moyen de chaque organisme témoin (§ 4.2 et 4.6). La longueur du corps possède un avantage sur le poids sec : on peut préserver les spécimens pour des analyses ultérieures (USEPA, 1994a), et les résultats, individuels (plutôt que de se rapporter au groupe, comme c'est le cas des pesées) peuvent servir à l'analyse de la variance à plusieurs critères de classification (Kemble *et al.*, 1994). On peut également automatiser la mesure de la longueur à l'aide d'un système de numérisation accouplé à un microscope et possédant une interface avec un ordinateur (USEPA, 1994a). Pour cet essai, on peut remplacer les mesures du poids sec par celles de la longueur à la condition que des études ultérieures avec des larves de chironomidés montrent sans l'ombre d'un doute que la longueur est un indicateur pour le moins aussi sensible de la croissance. Les résultats de Becker *et al.* (1995) témoignent en ce sens. Dans un essai de mesure de la survie et de la croissance effectué par Environnement Canada à l'aide de têtes-de-boule (EC, 1992c), la croissance est déterminée par le seul poids sec, et la longueur n'est pas un critère de détermination de l'effet, parce que l'augmentation de la masse et de l'épaisseur du corps d'individus sains ne se traduit pas toujours par une augmentation proportionnelle de la longueur du corps au cours de l'essai. Le même phénomène pourrait toucher les larves de chironomidés au cours d'essais de mesure de la survie et de la croissance après 10 jours.

On recommande également, comme paramètre utile de mesure, le calcul de la largeur moyenne de la capsule céphalique (± un écart-type) de chaque groupe de survivants à chaque variante (§ 4.6).

L'essai est invalide si le taux moyen de survie des témoins est de moins de 70 %. Il l'est également si le poids sec moyen des survivants est inférieur à 0,6 mg par *C. tentans* ou à 0,5 mg par *C. riparius* (§ 4.2).

On peut utiliser diverses méthodes statistiques pour évaluer les résultats de l'essai. Les possibilités, les motifs de choix et les méthodes de calcul sont l'objet d'une discussion en profondeur dans des rapports de l'USEPA (1989, 1994a et b) et d'Environnement Canada (1997d). Le choix du traitement statistique dépend du plan d'expérience et, plus particulièrement, de l'emploi de répétitions de sédiment non dilué ou de concentrations multiples d'une ou de plusieurs substances ou matières d'essai. Les sections 5 et 6 donnent des indications sur les paramètres de mesure et les calculs statistiques.

4.8 Essais avec toxique(s) de référence

Il faut utiliser systématiquement un toxique ou des toxiques de référence pour évaluer, dans des conditions normalisées, la sensibilité relative de l'élevage ou des élevages de *C. tentans* ou de *C. riparius* ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus en laboratoire. Le plus souvent, on effectue concurremment avec l'essai de mesure de la toxicité d'un sédiment par la *survie et la croissance* de larves de chironomidés (v. annexe E) des essais *avec de l'eau seulement* et un ou plusieurs toxiques de référence. Il existe et on continue de mettre au point des méthodes d'enrichissement des sédiments ou des méthodes toxicologiques de référence employant un *sédiment enrichi* (Burton, 1991 ; Suedel *et al.*, 1993a et b). Elles devraient se répandre. Nous recommandons, pour utilisation courante, un essai de référence d'une durée de 96 h, en conditions statiques, *dans l'eau seulement*, avec les essais de mesure de la toxicité des sédiments effectuées avec des larves de chironomidés, pratique suivie par l'USEPA (1994a). On peut compléter cet essai de référence ou le remplacer par au moins un essai employant un ou des *sédiments enrichis* d'un ou de plusieurs toxiques de référence, après normalisation des modes opératoires convenables. À cet égard, on devrait consulter le guide d'Environnement Canada sur l'emploi d'un sédiment témoin enrichi d'un toxique de référence (EC, 1995).

Le tableau 4 est une liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais toxicologiques de référence *dans l'eau seulement*, d'une durée de 96 h, en conditions statiques, employant *C. tentans* ou *C. riparius*. Le mode opératoire recommandé, qui a de nombreux points communs avec la méthode de l'USEPA (1994a), utilise des larves du deuxième stade de l'une ou de l'autre espèce au début de l'essai (10 par enceinte expérimentale) et au moins cinq concentrations plus un témoin (c'est-à-dire utilisant uniquement de l'eau témoin ou de l'eau de dilution) et au moins une répétition par variante. Les enceintes recommandées sont des bechers ou des jarres de verre de forme haute, d'une capacité de 300 mL et d'un diamètre intérieur d'environ 7 cm ; le volume recommandé de solution pour l'essai est de 200 mL par enceinte. Au cours de l'essai, on n'aère pas les solutions, et les

enceintes sont normalement couvertes, pour réduire au minimum la contamination et les pertes dues à l'évaporation. On devrait distribuer une suspension de 1,25 mL de flocons finement moulus d'aliment pour poissons du commerce (p. ex. Tetrafin[MC] ou Nutrafin[MC]), à raison de 4,0 mg de matière sèche par millilitre (v. § 4.4) dans chaque enceinte (y compris celles des témoins) aux jours 0 et 2 de l'essai (USEPA, 1994a).

Pour cet essai, la température et l'éclairage sont les mêmes que ceux que l'on a décrits pour la mesure définitive de la toxicité des sédiments (v. § 4.2 et tableaux 2 et 4). On observe chaque jour le nombre de cadavres ou de larves de chironomidés moribondes dans chaque enceinte. Pour chaque variante de l'expérience, on mesure : chaque jour, la température et la teneur en OD ; au début et à la fin de l'essai, le pH, l'alcalinité, la dureté et la conductivité de l'eau (§ 4.5). Les paramètres de mesure de l'essai sont le taux moyen de survie correspondant à chaque variante de l'expérience et la CL50 après 96 h. On doit déclarer invalides les résultats de l'essai toxicologique de référence si le taux moyen de survie des chironomidés dans l'eau témoin est inférieur à 90 % à la fin de l'essai (tableau 4).

Des critères appropriés de sélection de toxiques convenables de référence pourraient être les suivants (EC, 1990b et 1995) :

- le produit pur est facilement disponible ;
- il est chimiquement stable (longue durée de conservation) ;
- on peut le répartir également dans tout le substrat non pollué ;
- avec l'organisme d'essai, la relation entre la dose et la réaction est bonne ;
- le produit est stable en solution aqueuse ;
- il est peu dangereux pour l'utilisateur ;
- il est facile de le doser avec précision ;
- on connaît l'influence de la qualité de l'eau (p. ex. pH, dureté) sur la toxicité de la substance pour l'organisme d'essai ;
- on connaît l'influence des caractéristiques physico-chimiques du sédiment (p. ex. granulométrie, teneur en carbone organique) sur la toxicité de la substance pour l'organisme d'essai.

Tableau 4. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais toxicologiques de référence *dans l'eau seulement* employant des chironomes

Type d'essai	— Essai de mesure de la toxicité *dans l'eau seulement*, d'une durée de 96 heures, en conditions statiques.
Toxique de référence	— Sulfate de cuivre ($CuSO_4$), chlorure de cadmium ($CdCl_2$), chlorure de potassium (KCl) ou chlorure de sodium (NaCl).
Fréquence de l'essai	— Une fois par mois, en même temps que l'essai ou les essais définitifs sur des échantillons de sédiment.
Solutions d'essai	— Une solution témoin et au moins cinq concentrations d'essai.
Renouvellement des solutions	— Aucun

Eau témoin et eau de dilution	— Eau d'élevage ou n'importe quelle eau souterraine ou de surface non polluée ; eau douce reconstituée, si on recherche un haut degré d'uniformité ; teneur en OD de 90 à 100 % de la valeur de saturation lorsque utilisée dans l'essai.
Organismes d'essai	— *C. tentans* ou *C. riparius* ; au deuxième stade larvaire au début de l'essai ; on en met 10 par enceinte expérimentale.
Substrat pour les organismes	— Une couche de sable de silice.
Enceinte expérimentale	— Becher ou jarre de verre de forme haute, de 300 mL, d'environ 7 cm de diamètre interieur ; normalement couverte.
Volume de solution expérimentale	— 200 mL.
Nombre de répétitions	— Au moins une.
Température	— Moyenne journalière : 23 ± 1 °C ; instantanée : 23 ± 3 °C.
Éclairage	— Éclairage vertical, en spectre continu (fluorescents ou l'équivalent) ; 500 à 1 000 lux ; photopériode de 16 h.
Aération	— Aucune.
Alimentation	— Flocons moulus d'aliment pour poissons du commerce (p. ex. Tetrafin[MC] ou Nutrafin[MC]) ; 1,25 mL de suspension [38] dans chaque enceinte expérimentale au cours des journées 0 et 2.
Observations	— Journalières, dans chaque enceinte : le nombre de cadavres et de moribonds.
Mesures de la qualité de l'eau	— Pour chaque variante de l'expérience : mesures journalières de l'OD et de la température ; au début et à la fin de l'essai, mesures du pH, de l'alcalinité, de la dureté et de la conductivité.
Paramètres de mesure	— Taux moyen de survie, pour chaque variante de l'expérience ; CL50 après 96 h.
Validité de l'essai	— Les résultats de l'essai sont considérés comme invalides si le taux moyen de survie après 96 h dans l'eau témoin est inférieur à 90 %.

Il est recommandé d'employer avec *C. tentans* ou *C. riparius* le sulfate de cuivre, le chlorure de cadmium, le chlorure de potassium ou le chlorure de sodium de qualité réactif comme toxiques de référence (USEPA, 1994a). Il faut réaliser chaque mois un essai toxicologique de référence à l'aide d'élevages établis de chironomes du laboratoire et d'au moins l'un de ces toxiques si le laboratoire réalise couramment et fréquemment des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de larves de chironomidés (p. ex. hebdomadairement à mensuellement). On devrait également évaluer le comportement de tout élevage que l'on vient d'établir dans le laboratoire avec de nouveaux géniteurs, en utilisant le ou les toxiques de référence, avant de mettre ces géniteurs à la production d'organismes qui serviront aux essais (v. § 2.3.1 et 2.3.11).

Les rapports utiles d'Environnement Canada donnent des indications sur la sélection, la réalisation et l'utilisation d'essais toxicologiques de référence *dans l'eau seulement* (EC, 1990b) ou avec un *sédiment*

38. Chaque millilitre de suspension renferme 4,0 mg de matières sèches.

enrichi (EC, 1995). Il est conseillé au personnel de laboratoire peu au fait de ces essais de les consulter au préalable.

Il incombe au laboratoire de prouver qu'il peut obtenir des résultats constants et précis avec un ou des toxiques de référence, avant de passer aux dosages biologiques définitifs de la toxicité d'un sédiment au moyen de *C. tentans* ou de *C. riparius*. À cette fin, le personnel devrait d'abord déterminer la reproductibilité intralaboratoire de ses mesures, exprimée par un coefficient de variation (pourcentage), en effectuant au moins cinq essais avec le(s) toxique(s) de références et différents groupes de *C. tentans* ou de *C. riparius* provenant d'élevages séparés du laboratoire (USEPA, 1994a). Pour ces essais préliminaires, il devrait utiliser le ou les mêmes toxiques de référence, les mêmes concentrations, la même eau (de même origine) et le même mode opératoire (v. tableau 4). Les essais systématiques mensuels avec le ou les toxiques de référence devraient toujours suivre ce même mode opératoire. On devrait choisir une série de concentrations [39] auxquelles, d'après les essais préliminaires, correspondront un taux partiel de mortalité pour au moins deux de leurs valeurs et qui permettront de calculer la CL50 après 96 h avec un intervalle de confiance dont l'étroitesse est acceptable (v. § 6.5).

Quand on dispose d'un nombre suffisant de données (EC, 1990 et 1995), on doit porter sur une carte de contrôle les CL50 correspondant à un toxique de référence et déterminer si les résultats se situent à ± 2 écarts-types des résultats d'essais antérieurs au moyen du même toxique de référence et du même mode opératoire. Pour chaque toxique de référence qu'on utilise, on doit construire et actualiser une carte de contrôle. Sur l'axe vertical se trouverait le logarithme de la concentration ; sur l'axe horizontal, la date ou le numéro de l'essai. On devrait comparer chaque nouvelle CL50 du toxique de référence aux limites établies sur le graphique ; la CL50 est acceptable si elle est à l'intérieur de la zone de confiance.

Dans tous les calculs de la moyenne et de l'écart-type et sur tous les graphiques, on devrait utiliser le logarithme de la concentration (y compris de la CL50). C'est simplement une question d'adhérer à l'hypothèse selon laquelle on a estimé chaque CL50 d'après le logarithme des concentrations. On peut construire la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne ± 2 écarts-types sur du papier graphique ordinaire, ou en convertissant ces valeurs en valeurs arithmétiques et en portant ces dernières sur l'échelle logarithmique de papier semi-logarithmique. Si les CL50 se révèlent ne pas obéir à la loi log-normale, une moyenne et un écart-type arithmétiques pourraient mieux convenir.

On devrait recalculer, à l'obtention de chaque CL50 successive du toxique de référence, la moyenne des valeurs connues de log *CL50* ainsi que les limites de la zone de confiance (± 2 σ), tant que les statistiques ne se stabiliseront pas (EC, 1990, 1995, 1997d). Si une valeur donnée de la CL50 se retrouve à l'extérieur de ces limites, on soupçonne la sensibilité des organismes d'essai ainsi que la réalisation et la précision de l'essai. Comme le phénomène pourrait survenir 5 % du temps par le seul jeu du

---

39. V. l'annexe H pour des indications sur la gamme convenable de concentrations à sélectionner. Chaque concentration devrait être au moins la moitié de celle qui la précède.

hasard, une CL50 aberrante n'est pas nécessairement le signe d'une culture à la sensibilité anormale ou d'une précision insatisfaisante des données toxicologiques. Ce serait plutôt un avertissement. La vérification en profondeur de toutes les conditions et de toutes les méthodes d'élevage et d'essai serait indiquée. Selon ce qu'on découvrira, il pourrait falloir répéter l'essai toxicologique de référence, obtenir de nouveaux géniteurs ou établir de nouveaux élevages d'*âge connu*, avant d'entreprendre d'autres essais de mesure de la toxicité des sédiments.

Des résultats qui restent dans la zone de confiance, il ne faut pas déduire que le laboratoire obtient des résultats constants. Des données extrêmement variables sur un toxique de référence élargissent la zone de confiance. Une nouvelle donnée pourrait s'y retrouver en représentant un écart indésirable pour les résultats de l'essai. Environnement Canada (1990) propose comme limite raisonnable un coefficient de variation de pas plus de 30 %, de préférence 20 % ou moins.

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sédiment (ou de matières particulaires semblables) prélevé sur le terrain

La présente section renferme des instructions particulières sur la préparation d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou de matières particulaires semblables et sur la mesure de leur toxicité. Ces instructions s'ajoutent aux modes opératoires exposés dans la section 4. Au cours des essais portant sur ces échantillons, on devrait soit renouveler journellement l'eau surnageante, soit fonctionner en conditions statiques (v. section 4), selon les objectifs ou contraintes de chaque essai ou les lignes directrices ou les exigences réglementaires connexes.

Des instructions détaillées sur le prélèvement, la manutention, le transport, l'entreposage et l'analyse des sédiments prélevés sur le terrain se trouvent dans ASTM (1991b et 1995b) et Environnement Canada (1994). On devrait consulter ce dernier rapport sur ces questions et s'y conformer (en sus du présent document), pour le prélèvement et la préparation d'échantillons de sédiment sur le terrain en vue des essais toxicologiques avec *C. tentans* ou *C. riparius*.

5.1 Prélèvement de l'échantillon

Environnement Canada (1994) présente une synthèse utile du plan d'échantillonnage sur le terrain et des techniques convenant au prélèvement des échantillons. Les études toxicologiques des sédiments naturels par des essais biologiques employant des chironomes ou d'autres organismes convenables inféodés aux sédiments font souvent partie d'études plus vastes, qui pourraient englober : une batterie d'essais visant à évaluer la toxicité aiguë ou chronique du sédiment, de l'eau de porosité ou de l'élutriat ; des mesures de la bioaccumulation des contaminants ; des dosages chimiques ; des relevés des organismes de l'épifaune ou de l'endofaune et, peut-être, la collecte de données géologiques et hydrographiques. On peut améliorer la corrélation statistique et réduire les coûts en prélevant simultanément les échantillons destinés à ces essais, à ces analyses et à ces corpus.

Systématiquement et régulièrement (p. ex. trimestre, semestre ou année), on pourrait prélever, dans un certain nombre d'endroits, des échantillons de sédiment destinés à l'évaluation d'un effet négatif sur la survie et la croissance de *C. tentans* ou de *C. riparius*, dans un dessein de surveillance et d'application de la loi, ou en prélever en une ou en plusieurs occasions pour établir les limites spatiales (c'est-à-dire horizontales et verticales) ou temporelles de la qualité des sédiments. À chaque sortie, on devrait, en un ou plusieurs endroits, prélever un sédiment de référence (que l'on peut supposer être non contaminé) sur le terrain[40].

40. On prélève le sédiment de référence près de l'endroit que l'on veut étudier. Idéalement, il possède des caractéristiques géochimiques

Le nombre de stations d'échantillonnage à l'endroit étudié et le nombre d'échantillons répétés dans chaque station sont propres à chaque étude. Il faudra, la plupart du temps, faire un compromis entre les contraintes logistiques et pratiques (p. ex. le temps et les coûts) et les considérations statistiques. On devrait consulter Environnement Canada (1994) au sujet du plan d'échantillonnage, y compris le nombre minimal recommandé d'échantillons répétés de terrain.

À certaines fins de surveillance et d'application des règlements, on devrait prélever sur le terrain plusieurs échantillons répétés (c'est-à-dire distincts, prélevés au même endroit, mais dans des carottes différentes ou le contenu différent de bennes preneuses) dans chaque station d'échantillonnage, y compris dans au moins une station de référence (EC, 1992a, 1994 et 1997a). On doit mesurer la toxicité, à l'égard de *C. tentans* ou de *C. riparius*, de chacun de ces échantillons répétés, dans au moins cinq enceintes expérimentales par échantillon répété. L'*analyse statistique de la puissance* (v. § 5.6), au moyen des paramètres de mesure (*survie et croissance*) d'essais antérieurs avec des échantillons provenant de lieux identiques ou semblables, aidera à déterminer s'il faut inclure dans l'essai plus de cinq échantillons répétés de laboratoire (p. ex. 1 à 5 bechers ou jarres) pour chaque échantillon répété de terrain. En outre, des tests statistiques exigent un nombre minimal d'échantillons répétés. Pour d'autres motifs (p. ex. étude préliminaire ou vaste étude sur la répartition spatiale de la toxicité), le plan de l'étude pourrait prévoir un seul échantillon par station : dans ce cas, normalement, on l'homogénéiserait et on le répartirait entre au moins cinq enceintes expérimentales (répétitions de laboratoire). On se prive ainsi de toute possibilité de déterminer la toxicité moyenne à un emplacement donné (une station), mais cela permet la comparaison statistique de la toxicité de chaque échantillon avec celle du témoin et, si on le souhaite, la comparaison entre les échantillons d'essai (stations) à l'aide des tests statistiques convenables.

Pour le prélèvement du sédiment de référence, il faudrait rechercher les endroits où les propriétés géochimiques du sédiment sont semblables à celles du sédiment d'essai. Des différences marquées dans les caractéristiques du sédiment, notamment la granulométrie ou la teneur en matières organiques, pourraient influer sur les résultats des essais (v. § 1.4). On devrait prendre ces effets éventuels en considération lorsque l'on prépare le plan d'une étude comportant l'emploi de la présente méthode de dosage biologique. L'appariement de la teneur en carbone organique peut ne pas être indiqué dans les cas où la pollution (p. ex. par les usines de pâtes à papier ou par les égouts) augmente fortement la teneur des sédiments d'essai en matières organiques. Des études préliminaires visant à évaluer les propriétés géochimiques et la toxicité du sédiment dans la ou les régions préoccupantes ainsi que dans le voisinage sont utiles à la sélection des endroits propices au prélèvement du sédiment de référence.

---

semblables à celles du sédiment d'essai, mais en étant dépourvu des contaminants d'origine anthropique. Il n'est pas rare que les lieux de référence situés à proximité des sédiments d'essai présentent un certain degré de contamination anthropique. Dans certains cas, ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques naturelles pourraient rendre toxique le sédiment de référence (Burton, 1991).

On pourrait prélever des échantillons de boues municipales ou industrielles (p. ex. boues résiduaires, résidus miniers essorés, boues de clarificateur ou de bassin de décantation industriel), afin d'évaluer leurs effets nocifs sur la survie et la croissance de *C. tentans* ou de *C. riparius*, faire des analyses géochimiques et doser les contaminants. On pourrait aussi prélever d'autres résidus particulaires (p. ex. boues de forage) en vue d'une évaluation toxicologique et chimique.

La méthode de prélèvement (c'est-à-dire carottier, benne, drague ou échantillon composé) dépend des objectifs de l'étude et de la nature des sédiments ou des autres matières particulaires à prélever. Les différents appareils de même que leurs avantages et inconvénients respectifs sont résumés dans Environnement Canada (1994), et on trouve d'autres détails ailleurs (de Groot et Zschuppe, 1981 ; Baudo *et al.*, 1990 ; Burton, 1992 ; Sly et Christie, 1992 ; ASTM, 1995b).

Pour perturber le moins possible l'échantillon, on devrait utiliser une benne preneuse benthique ou un carottier plutôt qu'une drague. On devrait prélever le sédiment dont on veut évaluer la toxicité et les propriétés chimiques à au moins une profondeur représentative de la couche ou des couches préoccupantes (p. ex. couche superficielle de 2 cm, ou plus profonde si le dépôt de contaminants au cours d'un passé plus ou moins récent est ce qui intéresse).

Il faut également veiller à réduire au minimum les pertes de fines particules au cours du prélèvement. Si on utilise la benne preneuse, il faudrait prélever au moyen de carottiers manuels un échantillon des 2 cm superficiels ou de la couche voulue du sédiment d'essai ramené en surface. À cette fin, on ouvre la benne par le haut pour exposer la surface du sédiment non perturbé. On devrait recueillir l'échantillon dans un récipient de verre ou de plastique propre.

Avant d'entreprendre un programme d'échantillonnage, on devrait calculer le volume requis de sédiment par échantillon (EC, 1994), en tenant compte de la quantité exigée pour préparer les répétitions en laboratoire des essais toxicologiques, de même que des répétitions exigées pour caractériser la granulométrie, les taux de matière organique et d'humidité et analyser certaines substances chimiques. On a normalement besoin d'au moins 5 à 7 L de sédiment par échantillon (EC, 1994) ; mais cela dépend des objectifs et du plan de l'étude ainsi que de la nature des analyses chimiques à effectuer. Pour obtenir le volume nécessaire d'échantillon, il faut souvent réunir des sous-échantillons prélevés à l'aide du dispositif d'échantillonnage. On devrait suivre les instructions données dans EC (1994) pour obtenir un échantillon composé à partir des sous-échantillons prélevés sur le terrain.

On devrait utiliser dans tous les endroits échantillonnés sur le terrain la même méthode de prélèvement. On devrait consulter Environnement Canada (1994) pour obtenir plus de conseils sur les dispositifs et les modes opératoires convenables.

5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse de l'échantillon

Les récipients servant au transport et à l'entreposage des échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou de matières particulaires semblables doivent être d'un

matériau non toxique. Le choix du récipient dépend à la fois du volume d'échantillon et de ses éventuelles utilisations finales. On devrait consulter Environnement Canada (1994) pour obtenir des indications sur le choix des récipients convenables. Ces derniers doivent être soit neufs, soit avoir été nettoyés à fond puis rincés avec de l'eau d'essai ou une autre eau non contaminée (p. ex. distillée ou désionisée) avant emploi.

On devrait remplir complètement le récipient de l'échantillon, pour qu'il n'y subsiste pas d'air. Immédiatement après, il faut le sceller, l'étiqueter ou le coder. L'étiquette et les enregistrements doivent alors porter ou comprendre au moins le code ou la description de la nature de l'échantillon (p. ex. prélevé par benne, par carottier, échantillon composé), de son origine, de l'emplacement précis (c'est-à-dire nom de l'étendue d'eau, coordonnées géographiques, profondeur) d'où il provient, le numéro de répétition de l'échantillon, la date du prélèvement ainsi que (facultativement) le nom et la signature du ou des préleveurs. Ces derniers devraient aussi conserver des dossiers circonstanciés sur :

- la nature, l'aspect, le volume de l'échantillon ;
- la méthode et le dispositif utilisés ;
- toute méthode d'obtention, sur le terrain, d'échantillons composés ou de sous-échantillons de carottes ou d'échantillons prélevés par benne ;
- le nombre d'échantillons répétés prélevés dans chaque station ;
- le calendrier des prélèvements ;
- le nombre de récipients utilisés pour le transport des échantillons et leur nature ;
- les paramètres physico-chimiques mesurés sur place (p. ex. température, pH, OD) dans la colonne d'eau et les sédiments ;
- les méthodes utilisées pour refroidir et transporter les échantillons et les conditions dans lesquelles ces opérations ont eu lieu.

Avec de la glace ou des sachets réfrigérants, on devrait refroidir entre 1 et 7 °C les échantillons tièdes (> 7 °C), dès leur prélèvement, et les maintenir au frais (4 ± 3 °C) et à l'obscurité durant leur transport. Au besoin, on devrait utiliser des sachets réfrigérants, de la glace ou d'autres moyens de réfrigération pour que la température des échantillons se maintienne entre 1 et 7 °C durant le transport.

Il faut enregistrer la date de réception du ou des échantillons au laboratoire. On devrait aussi mesurer et enregistrer leur température à leur réception. Il faut garder dans des récipients étanches et à l'obscurité, à 4 ± 2 °C, les échantillons à entreposer pour usage ultérieur (EC, 1994 et 1997a). On devrait purger à l'azote l'espace d'air des récipients, puis fermer ces derniers de façon étanche (EC, 1994). Les échantillons ne doivent pas geler, ni en totalité ni en partie, au cours du transport ou de l'entreposage, et on ne doit pas les laisser sécher (EC, 1992a, 1994, 1997a et b). On recommande de les soumettre aux essais le plus tôt possible après le prélèvement. L'essai toxicologique devrait débuter dans les deux semaines après le prélèvement, de préférence dans la semaine après, mais pas plus de six semaines après[41].

---

41. La toxicité et les caractéristiques géochimiques des sédiments contaminés de port de Hamilton auraient commencé à s'altérer après plus d'une semaine, mais on n'a pas fourni les données étayant

Idéalement, afin d'aider à caractériser l'échantillon, on devrait mesurer sur le terrain les caractéristiques instables du sédiment (p. ex. pH, potentiel d'oxydo-réduction) ou celles sur lesquelles influent les conditions de transport et d'entreposage (p. ex. température). Au laboratoire, on devrait le mélanger à fond (§ 5.3) et en prélever des sous-échantillons représentatifs en vue de la caractérisation physico-chimique. Il faut caractériser chaque échantillon (y compris de sédiment témoin et de référence) par l'analyse, dans des sous-échantillons, des paramètres suivants (USEPA, 1994a) : dans le sédiment entier, la granulométrie (pourcentage de sable grossier, moyen et fin, de limon et d'argile), le pourcentage d'eau et la teneur en carbone organique total ; dans l'eau de porosité, le pH et l'ammoniaque (totale et non ionisée ; v. § 4.5). On pourrait aussi caractériser (USEPA, 1994a ; APHA *et al.*, 1995) : le carbone organique total, les matières volatiles totales, la demande biochimique en oxygène, la demande chimique en oxygène, la capacité d'échange cationique, la teneur en sulfures volatils acides, en métaux, en composés organiques de synthèse, en huiles et en graisses, en hydrocarbures pétroliers et déterminer les diverses caractéristiques physico-chimiques de l'eau de porosité. Sauf indication contraire, on devrait effectuer des analyses chimiques, physiques et toxicologiques identiques sur des sous-échantillons représentatifs de chaque échantillon répété de sédiment prélevé sur le terrain (y compris du sédiment de référence) pour une étude donnée de la qualité des sédiments ainsi que sur un sous-échantillon, au moins, du sédiment témoin.

5.3 Préparation de l'échantillon en vue des essais

Normalement, on ne devrait pas soumettre, en vue des essais, le sédiment prélevé sur le terrain ou les matières particulaires semblables à un tamisage hydraulique, car on pourrait éliminer les contaminants de l'eau de porosité ou ceux dont la sorption sur les grains est faible (EC, 1994). On devrait normalement enlever les gros débris ou les gros macro-organismes indigènes à l'aide de pincettes ou à la main gantée.

Les macro-organismes indigènes peuvent ralentir la croissance des larves de chironomidés au cours des essais de mesure de la toxicité des sédiments d'eau douce et embrouiller l'interprétation des résultats (Reynoldson *et al.*, 1994). Si l'échantillon en renferme beaucoup, que l'on ne peut pas extraire avec des pincettes, on peut passer l'échantillon au travers d'un ou de plusieurs tamis de maillages convenables, par pressage (et non par lavage). Par rinçage, on peut passer au tamis fin (p. ex. à maillage de 0,25 à 0,5 mm ; Day *et al.*, 1995b) les sédiments renfermant de petits macro-organismes impossibles à éliminer par tamisage sous

---

cette affirmation (Brouwer *et al.*, 1990). Othoudt *et al.* (1991) ont constaté que la toxicité d'échantillons de sédiments d'eau douce changeait peu du début à la fin de 7 à 112 j d'entreposage à 4 °C. Burton (1991) et l'USEPA (1994a) signalent diverses études montrant que, parfois, la toxicité d'un sédiment conservé à 4 °C est inaltérée après plusieurs mois et que, dans d'autres cas, on en observe l'altération en quelques jours ou quelques semaines. Le délai recommandé de deux semaines reprend le conseil d'Environnement Canada (1992a, 1997a et b) à l'égard d'autres essais toxicologiques sur les sédiments. Environnement Canada (1994) recommande le délai admissible maximal de six semaines avant les essais toxicologiques, en raison des difficultés pratiques qu'entraîne un délai plus court et, le cas échéant, du temps pris par les analyses chimiques initiales.

pression mécanique en raison des caractéristiques de ces sédiments. Le liquide de rinçage est celui qui s'est séparé de l'échantillon au cours du transport et/ou de l'entreposage. On doit mêler de nouveau ce liquide avec l'échantillon tamisé (§ 4.1).

Le tamisage pourrait modifier la concentration ou la biodisponibilité des contaminants présents dans le sédiment ou altérer sa granulométrie ou sa teneur en éléments nutritifs (EC, 1994 ; Day *et al.*, 1995b). Si on tamise le sédiment, il est donc recommandé d'en mesurer les propriétés physico-chimiques (p. ex. les métaux présents dans l'eau de porosité, la répartition granulométrique) avant et après. Dans certains cas, on pourrait devoir aussi effectuer des essais toxicologiques comparatifs sur un sédiment tamisé et un sédiment non tamisé, afin d'élucider l'effet du tamisage sur la toxicité de l'échantillon.

À moins que les objectifs de la recherche ou d'études spéciales n'en décident autrement, on devrait homogénéiser au laboratoire chaque échantillon de matière d'essai prélevé sur le terrain avant de l'utiliser (EC, 1994 ; USEPA, 1994a)[42]. Le mélange peut lui aussi modifier la concentration et la biodisponibilité des contaminants présents dans le sédiment, et l'homogénéisation pourrait ne pas être souhaitable dans tous les cas.

Pour obtenir un échantillon homogène, on le mélange dans le récipient qui a servi à son transport et à son entreposage ou on le transvase dans un récipient propre de mélange. On peut mélanger l'échantillon à l'aide d'un ustensile non toxique (p. ex. cuillère ou spatule d'acier inoxydable), jusqu'à ce que sa couleur et sa texture soient homogènes (EC, 1992a). On peut également utiliser une méthode mécanique (EC, 1994 ; USEPA, 1994a). Les conditions du mélange, y compris la durée et la température, doivent être aussi semblables que possible pour chaque échantillon utilisé dans un essai. Si on doute de l'efficacité du mélange de l'échantillon, on devrait ensuite en prélever des sous-échantillons et les analyser séparément pour en déterminer l'homogénéité.

Immédiatement après le mélange de l'échantillon, il faut prendre les sous-échantillons exigés par l'essai toxicologique et les analyses physico-chimiques, puis les répartir dans des enceintes expérimentales étiquetées (§ 4.1) et des récipients étiquetés de conservation en vue d'analyses physico-chimiques ultérieures. On devrait alors transvaser dans des récipients étiquetés le reliquat de l'échantillon homogénéisé dont on pourrait avoir besoin pour des essais toxicologiques supplémentaires employant des chironomes ou d'autres organismes. On devrait conserver tous les sous-échantillons dans des récipients scellés, sans espace d'air, et on doit les conserver à l'obscurité, à 4 ± 2 °C (§ 5.2) jusqu'à leur utilisation ou analyse. Immédiatement avant de l'utiliser dans une analyse ou un essai toxicologique, on devrait mélanger de nouveau à fond chaque sous-échantillon, afin de s'assurer de son homogénéité.

---

42. On homogénéise systématiquement les échantillons parce que, entre autres raisons, on veut mélanger de nouveau avec le sédiment toute l'eau de porosité qui remonte à sa surface au cours du transport et de l'entreposage. L'homogénéisation est également nécessaire pour redistribuer les constituants de l'échantillon qui se sont tassés et séparés en couches (d'après la taille des particules) au cours du transport et de l'entreposage.

5.4 Eau d'essai

Dans les essais employant un sédiment prélevé sur le terrain ou toute autre matière particulaire semblable, l'eau admise dans les enceintes expérimentales (c'est-à-dire l'eau surnageante) peut provenir de la même source que l'eau utilisée pour l'élevage des larves de chironomidés (v. § 2.3.4 et 3.4). Cette eau peut également provenir d'une source séparée d'alimentation en eau douce naturelle ou être de l'eau reconstituée. Pour certaines applications, le plan de l'expérience pourrait exiger ou avaliser l'emploi d'eau douce prélevée dans le lieu de référence à proximité du lieu de prélèvement des sédiments d'essai. Il est souvent judicieux d'employer de l'eau non contaminée locale ou de l'eau non contaminée dont la dureté est réglée à la dureté de l'eau locale, parce qu'un changement de dureté influe sur la toxicité des métaux et des contaminants organiques présents dans le sédiment. Le § 2.3.4 donne des indications sur la préparation et l'analyse de l'eau qui servira d'eau surnageante.

5.5 Observations et mesures au cours de l'essai

Lorsque l'on met sur pied l'essai, on devrait rédiger une description qualitative de chaque matière d'essai prélevée sur le terrain, notamment de la couleur de l'échantillon, de sa texture et de son homogénéité, en notant la présence de végétaux, d'animaux (y compris de leurs traces ou de leurs trous) [EC, 1992a et 1997a]. On devrait noter et signaler toute modification de l'aspect des matières et de l'eau que l'on observe pendant l'essai ou à la fin.

On devrait mesurer durant l'essai ou à son début et à sa fin, comme il est décrit au § 4.5, la qualité de l'eau surnageante (p. ex. pH, température, dureté, alcalinité, teneur en ammoniaque, teneur en OD). Selon les objectifs du test et le plan d'expérience, on pourrait aussi prévoir des enceintes séparées au début de l'essai (§ 4.1) pour surveiller les caractéristiques chimiques du sédiment entier et/ou de l'eau de porosité (USEPA, 1994a). Les prélèvements qu'on y ferait, au début et à la fin de l'essai, seraient destructifs. Selon les objectifs de l'étude, on pourrait ajouter ou non des organismes vivants aux enceintes supplémentaires. Pour les dosages portant sur le sédiment ou l'eau de porosité de ces enceintes, on peut siphonner la plus grande partie de l'eau surnageante, sans perturber la surface du sédiment, puis prélever des parties aliquotes du sédiment en vue des analyses qui conviennent (v. § 5.2). Si on voulait analyser l'eau de porosité, la centrifugation sans filtration serait recommandée (USEPA, 1994a ; EC, 1994). On devrait consulter Environnement Canada (1994) pour obtenir des conseils sur la marche recommandée à suivre pour l'extraction de l'eau de porosité, son traitement et son entreposage avant analyse.

Selon les objectifs de l'étude et la nature du sédiment d'essai (par ex., riche en matières organiques), on pourrait mesurer le pH de l'eau de porosité et doser l'ammoniaque, à mesure que se déroule l'essai, en affectant des enceintes à cette fin (EC, 1994 ; USEPA, 1994a). On pourrait surveiller dans les mêmes enceintes d'autres caractéristiques (par ex., les métaux, le sulfure d'hydrogène, les matières volatiles totales, le potentiel d'oxydo-réduction). Si on voulait surveiller ces variables, on devrait y affecter au moins une enceinte par variante, et les prélèvements y seraient destructifs.

5.6 Paramètres de mesure et calculs

L'interprétation des essais employant des échantillons de sédiments se résume toujours à une comparaison des effets biologiques observés dans ces derniers et des effets observés dans un sédiment de référence. Chaque fois que c'est possible ou convenable, on devrait utiliser un échantillon de référence comme point de comparaison, parce que, ainsi, on obtient une évaluation de la toxicité locale (USEPA, 1994a). Parfois, le sédiment de référence pourrait ne pas convenir aux comparaisons, en raison de sa toxicité ou de caractéristiques physico-chimiques atypiques. Il faudrait alors comparer les sédiments d'essai au sédiment témoin. Les résultats obtenus à l'aide d'un ou de plusieurs sédiments témoins aideront à distinguer les effets des contaminants de ceux d'autres causes, par exemple la granulométrie ou la teneur en carbone organique. Que le sédiment de référence ou le sédiment témoin serve ou non aux comparaisons statistiques, il faut utiliser les résultats donnés par le sédiment témoin pour juger de la validité et de l'acceptabilité de l'essai (§ 4.2).

L'analyse des résultats diffère selon l'objet de l'essai et son plan d'expérience. Le présent paragraphe aborde les méthodes d'analyse, de la plus simple à la plus complexe. Les méthodes statistiques normales sont généralement tout ce dont on a besoin pour analyser les résultats. On devrait consulter Environnement Canada (1997d), USEPA (1994a, section 14) et USEPA/USACE (1994 ; annexe D) pour obtenir des indications sur les paramètres convenables de mesures statistiques et leurs calculs. Comme toujours, on devrait chercher à obtenir les conseils d'un statisticien qui connaît bien la toxicologie pour établir les plans d'expérience des essais et analyser les résultats.

L'analyse de la variance (ANOVA) et les tests de comparaisons multiples servent souvent à l'interprétation statistique des résultats des essais employant des sédiments. Cette approche, fondée sur les tests d'hypothèses, souffre de points faibles notables, que nous décrivons au § 6.5.3. Relevons par exemple le fait que toute augmentation de la variabilité affaiblira la capacité du test de distinguer les effets toxiques, aboutissant ainsi à un paramètre de mesure qui est une concentration plus forte (c'est-à-dire que le test conclut à une toxicité moindre). De même, l'utilisation d'un petit nombre seulement d'échantillons répétés nuira au pouvoir discriminatoire du test et mènera à la conclusion d'une toxicité apparente moindre, toutes autres choses étant égales (v. § 5.6.2). Il n'existe pas de solution de rechange aux tests d'hypothèse pour l'analyse de la plupart des essais toxicologiques employant des sédiments, parce que ces essais n'emploient d'échantillons que d'une concentration, habituellement non diluée. Des moyens meilleurs permettent d'estimer ponctuellement la toxicité, si les essais portent sur diverses concentrations (v. section 6).

Les analyses paramétriques au moyen de l'ANOVA et de tests de comparaisons multiples partent de l'hypothèse selon laquelle les données obéissent à la loi de distribution normale et que la variance est homogène, d'un groupe à l'autre. Dans un premier temps de l'analyse, on devrait vérifier ces hypothèses au moyen du *test de Shapiro-Wilk* (détermination de la normalité de la distribution des données) et du *test de Bartlett* (sur l'homogénéité de la variance)

[Eisenhart *et al.*, 1947 ; Sokal et Rohlf, 1969]. Si, d'après ces tests, les données sont satisfaisantes, on peut procéder à l'analyse. Sinon, on pourrait les transformer (p. ex. en racines carrées, en logarithmes ou en racines carrées d'arc sinus, dans le cas des données quantiques qui doivent servir à l'analyse quantitative ; Mearns *et al.*, 1986). Les tests de normalité et d'homogénéité pourraient ensuite montrer la conformité aux critères de normalité et d'homogénéité et, de fait, c'est une issue probable de la transformation.

Les tests paramétriques sont en réalité tout à fait robustes devant les écarts modérés par rapport à la normalité et à l'égalité de la variance. L'analyse paramétrique (p. ex. ANOVA et comparaisons multiples) devrait donc aller de l'avant, même s'il subsiste une non-conformité modérée après la transformation. Le fait d'exclure un ensemble de données en raison d'irrégularités mineures pourrait priver l'expérimentateur d'une analyse satisfaisante et sensible ainsi que de la détection des effets réels de la toxicité [43]. On devrait également procéder à l'analyse au moyen de tests parallèles non paramétriques, la plus sensible (celle dont la valeur du paramètre de mesure est inférieure) des deux analyses donnant l'estimation finale de la toxicité (pour plus d'explications et une justification, consulter Environnement Canada, 1977d).

Avec les sédiments, les boues ou les matières particulaires semblables, on pourrait effectuer des tests employant plusieurs concentrations. On pourrait mélanger des quantités mesurées de l'échantillon d'essai avec des quantités mesurées d'un sédiment naturel ou d'un sédiment témoin reconstitué (v. § 3.5 et 6.2). Les méthodes de mélange de différents échantillons de sédiments n'étant pas encore normalisées ni éprouvées (v. § 6.2), il est conseillé de faire attention à l'éventuelle non-linéarité des réactions et des modifications de la biodisponibilité ou des caractéristiques de sorption (Nelson *et al.*, 1994). On recommande au moins cinq sous-échantillons pour fournir des prises d'essai répétées de chaque concentration, afin de déterminer l'homogénéité des échantillons et la précision de l'essai. Nous décrivons dans le § 6.5 les analyses statistiques permettant de déterminer les paramètres de mesure.

5.6.1 Variations dans le plan d'expérience et dans les analyses

Un essai très préliminaire pourrait ne compter qu'un échantillon d'essai et qu'un échantillon de référence, sans répétition. Un simple regard aux résultats pourrait donner une idée du plan d'études plus vastes.

Si on avait utilisé un seul échantillon d'essai et un seul échantillon de référence, chacun répétés un nombre égal de fois, le *test t ordinaire de Student* conviendrait à l'analyse (Paine et McPherson, 1991a). Ce test est assez robuste. On devrait l'utiliser dans sa formule intégrale, qui peut alors s'adapter aux données irrégulières. La formule accepte un nombre inégal de répétitions des échantillons d'essai et des échantillons de

---

43. Les tests de la normalité et de l'homogénéité perdent en signification, en raison des petits échantillons utilisés en écotoxicologie. Les graphiques et l'examen de la nature générale de la répartition et des écarts apparents peuvent être plus révélateurs : ce sont les moyens recommandés (EC, 1977d). L'égalité de la taille des échantillons et l'ampleur des variations sont probablement des facteurs plus importants pour l'issue de l'analyse paramétrique, mais les toxicologues s'y sont peu attardés. La robustesse de l'ANOVA est démontrée par sa capacité de produire des probabilités réalistes si les données sont distribuées de façon raisonnablement symétrique et si le rapport entre les variances de chaque variante va du simple au moins du triple l'une de l'autre (Newman, 1995).

référence ainsi que l'inégalité de la variance des deux groupes d'échantillons (USEPA/USACE, 1994). Si on n'avait utilisé que des *échantillons répétés de laboratoire*, l'interprétation des résultats serait différente de celle des résultats d'une étude dans laquelle il y aurait des *échantillons répétés de terrain*, comme nous le décrivons ci-dessous à l'égard de l'analyse de la variance.

On pourrait imaginer une étude préliminaire effectuée avec des échantillons prélevés en de nombreuses stations, mais sans répétition sur le terrain ni en laboratoire (intra-échantillon). Le but visé serait de reconnaître un nombre réduit de stations d'échantillonnage qui méritent une étude plus détaillée et plus approfondie. Les occasions d'analyse statistique seraient limitées. On pourrait comparer les résultats des essais non répétés aux résultats obtenus d'échantillons de référence, en employant des méthodes de détection des valeurs aberrantes (USEPA, 1994a ; Newman, 1995 ; EC, 1997d). L'échantillon serait considéré comme toxique si on en rejetait les résultats parce qu'ils sont extrêmes par rapport aux résultats donnés par des échantillons de référence ou des échantillons témoins.

Une façon plus habituelle d'étudier les sédiments serait de prélever des échantillons en plusieurs endroits, par les mêmes méthodes et en comparant les échantillons avec un seul échantillon de référence ou un seul témoin. Plusieurs pistes s'offrent à l'analyse, selon le type de données et leur qualité, mais, souvent, l'*analyse de la variance (ANOVA)* serait suivie d'un des tests de comparaison multiple. Dans l'ANOVA, on considérerait également l'échantillon de référence comme un « emplacement ».

Dans ces études de plusieurs emplacements, le type de répétition influerait sur l'interprétation des résultats. Il pourrait y avoir un échantillon dans chacun des emplacements, les *échantillons répétés de laboratoire* étant obtenus par subdivision de chaque échantillon. L'ANOVA à un critère de classification distinguerait alors s'il existe une différence générale entre les emplacements, différence supérieure à la variabilité de base dans les méthodes *intralaboratoire* de mise sur pied et de réalisation de l'essai. L'analyse statistique n'évaluerait pas réellement la variabilité du prélèvement des échantillons, sauf que cette variabilité contribuerait à toute différence observée entre les emplacements. Si on prélevait des *échantillons répétés de terrain* dans chacun des emplacements et si on n'utilisait aucun échantillon répété de laboratoire, le même type d'ANOVA à un seul critère de classification évaluerait l'écart général entre les emplacements, en sus de la variabilité *combinée* du prélèvement des échantillons dans l'emplacement et de la réalisation de l'essai. Il serait inhabituel, mais beaucoup plus puissant, de disposer d'échantillons répétés de terrain pour tous les emplacements des échantillonnages et, aussi, d'échantillons répétés de laboratoire de chaque échantillon répété sur le terrain. Ainsi, les échantillons répétés de laboratoire deviendraient les échantillons répétés d'une analyse de variance à un critère niché de classification et ils constitueraient la base de la variabilité pour la comparaison des différences entre les échantillons. L'ANOVA pourrait servir à constater : *a*) s'il existe une différence globale entre les emplacements ; *b*) s'il existe une différence globale entre les échantillons répétés prélevés en divers emplacements. Après l'ANOVA, l'analyse

passerait ensuite à un ou plusieurs tests de comparaison multiple, que nous décrivons dans le paragraphe ci-dessous.

Après l'application de l'ANOVA aux études réalisées sur plusieurs emplacements, on peut utiliser différents tests statistiques. Si on voulait comparer chacun des emplacements de l'échantillonnage avec l'emplacement de référence, pour voir si les deux sont différents, on devrait utiliser le *test de Dunnett*. Ce test suppose la normalité de la distribution des données et l'égalité des variances. Il se fonde sur une valeur *expérimentale* d'α (la probabilité de déclarer significatif un écart de fait inexistant). Si le nombre de répétitions est inégal, on devrait obtenir les conseils d'un statisticien ou adopter la comparaison complète des emplacements, décrites dans le paragraphe qui suit.

Étudiant plusieurs emplacements d'échantillonnage, on pourrait vouloir connaître ceux qui diffèrent des autres et ceux qui diffèrent de l'emplacement de référence ou de l'emplacement témoin. Ce serait par exemple le cas d'un certain nombre d'emplacements « en aval de l'émissaire » d'un effluent : on pourrait vouloir connaître les emplacements où la toxicité est significativement supérieure et où la dépollution est particulièrement indiquée. Le *test de Tukey* convient à cette analyse et on le trouve souvent dans les progiciels statistiques. Il peut s'attaquer aux échantillons de tailles différentes [44].

Si on voulait comparer chacun des emplacements d'échantillonnage avec l'emplacement de référence, mais si les données ne se conformaient pas aux exigences de la normalité de leur distribution et de l'égalité de leur variance, on remplacerait l'ANOVA et les tests ultérieurs par des tests non paramétriques. On utiliserait le *test de classement multiunivoque de Steel*, si le nombre de répétitions était égal, tandis que, dans le cas contraire, il faudrait utiliser le *test de Wilcoxon* (de sommations des rangs) avec la *correction de Bonferroni*.

5.6.2 *Analyse de la puissance*

Un facteur important à considérer dans l'analyse des résultats des essais toxicologiques employant des échantillons de sédiment est le risque d'obtenir des « faux positifs » (c'est-à-dire de conclure qu'un endroit propre est souillé), ou des « faux négatifs » (c'est-à-dire de conclure à la propreté d'un endroit souillé). Les

---

44. Une autre méthode est actuellement recommandée pour les essais portant sur les sédiments aux États-Unis. (USEPA, 1994a ; USEPA/USACE, 1994). Quand les échantillons répétés sont en nombre égal, la méthode de l'*écart le moins significatif de Fisher* (dit *test LSD [least significant difference] de Fisher*) passe pour être supérieure. Ce test se fonde sur un « taux d'erreur par paire inférieur » relativement à α, dans la comparaison d'un emplacement donné à un autre, mais il maintient la valeur globale d'α à la valeur présélectionnée (habituellement 0,05). Ce test est rarement présent dans les progiciels concernant la toxicité, mais certains manuels le décrivent (p. ex. Steel et Torrie, 1980) et il est exposé en détail dans l'annexe D d'USEPA/USACE (1994). Nous recommandons plutôt le *test de Tukey*, en partie parce que la méthode LSD de Fisher pourrait conclure trop facilement au caractère significatif des écarts. La méthode LSD de Fisher n'est prévue que pour un petit nombre de toutes les comparaisons possibles dans un ensemble de données, et ces comparaisons devraient être précisées d'avance. Dans les recommandations américaines actuelles pour les comparaisons appariées, le nombre inégal de répétitions exigerait d'appliquer la *correction de Bonferroni au test t*, pour remplacer le *test LSD* (USEPA, 1994a). Ce test *t* corrigé permet toutes les comparaisons possibles entre les emplacements.

scientifiques, habituellement très prudents quand il s'agit de choisir le niveau de signification (α) pour tolérer les faux positifs (erreur de type I), le fixent habituellement à P = 0,05 ou 0,01. Dernièrement, on a enjoint aux toxicologues de signaler à la fois α et la puissance statistique ($1 - \beta$), c'est-à-dire la probabilité de rejeter avec raison l'hypothèse nulle (H_0) et de ne pas commettre une erreur de type II. Plusieurs facteurs influent sur la puissance statistique, notamment :

- la variabilité des échantillons répétés de la même variante de l'expérience ;
- α (c'est-à-dire la probabilité de commettre une erreur de type I) ;
- l'amplitude de l'effet (c'est-à-dire l'amplitude de l'effet véritable qui est l'objet de l'essai) ;
- n (c'est-à-dire le nombre d'échantillons ou de répétitions utilisés dans l'essai).

On peut se servir de l'analyse de puissance pour déterminer *a priori* l'amplitude de l'erreur de type II et la probabilité de résultats faussement positifs. On peut également s'en servir pour s'assurer du nombre convenable d'échantillons répétés de laboratoire et de terrain pour des études ultérieures, qui comprendront l'essai, ou pour aider à la sélection d'éventuels lieux d'échantillonnage. Il est toujours prudent d'utiliser le plus grand nombre économique et logistique possible de répétitions dans le plan d'expérience (v. § 5.1) ; l'analyse de la puissance aidera à cette détermination. On peut trouver dans USEPA (1994a) une bonne explication de la puissance d'un test et de la façon de l'évaluer, tandis qu'il en est question dans une certaine mesure dans EC (1997d).

Modes opératoires particuliers pour les essais employant des sédiments enrichis

Dans la présente section, on trouvera des instructions et des conseils sur la préparation et l'utilisation, dans des essais, de sédiments témoins ou autres, additionnés, pour les besoins de l'expérience, de substance(s) chimique(s), de sédiment contaminé ou de mélanges complexes de déchets. Ces recommandations s'ajoutent aux marches à suivre de la section 4. Environnement Canada (1995) donne des conseils plus détaillés pour enrichir les sédiments et réaliser des essais toxicologiques avec des mélanges de substances chimiques et de sédiments. Selon les objectifs ou les contraintes de l'essai et les lignes directrices ou exigences connexes des règlements, ces essais peuvent se dérouler dans une eau renouvelée quotidiennement ou en conditions statiques (v. section 4). Pour l'application des règlements, on pourrait avoir besoin d'une évaluation et d'une uniformisation plus poussées des méthodes d'enrichissement des sédiments (§ 6.2) avant d'évaluer la toxicité de mélanges précis de sédiments et de substances chimiques à l'aide de chironomes ou d'autres organismes convenables.

On peut examiner expérimentalement la ou les causes de la toxicité du sédiment et les interactions de la toxicité d'une ou de plusieurs substances chimiques, du sédiment contaminé ou des déchets particulaires réunis à un sédiment (par ailleurs non contaminé), en enrichissant un sédiment témoin *non contaminé* de ces substances ou matières. L'enrichissement pourrait se faire au moyen d'une ou de plusieurs substances chimiques, d'un autre sédiment (contaminé ou non) ou de matières particulaires semblables (p. ex. boue de dragage à laquelle est mélangé du sédiment d'un lieu d'immersion existant ou projeté en eau douce). L'emploi d'une gamme de concentrations d'enrichissement permettrait d'estimer la CL50 et de déterminer les concentrations provoquant des effets sublétaux. L'enrichissement permet aussi de mesurer l'influence des caractéristiques physico-chimiques du sédiment naturel ou artificiel sur la toxicité chimique. Les essais toxicologiques de référence peuvent employer un sédiment témoin enrichi de la substance chimique convenable (v. § 4.8). On trouvera dans la présente section des recommandations et des instructions sur la réalisation d'essais avec un sédiment enrichi. (On trouve des conseils supplémentaires dans USEPA [1994a] et EC [1995].)

6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon

On devrait se renseigner sur les propriétés de la substance chimique, du sédiment contaminé ou du déchet particulaire que l'on veut diluer dans un sédiment témoin ou autre. À l'égard des échantillons de sédiment contaminé ou d'une matière particulaire semblable, on devrait suivre les instructions données sur la caractérisation de l'échantillon (§ 5.2). Pour ce qui concerne les produits chimiques, les substances chimiques (p. ex. les produits formulés) ou les mélanges chimiques individuels, on devrait obtenir l'information qui existe sur la

concentration des principaux ingrédients et des principales impuretés, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation, la toxicité pour l'homme et les organismes aquatiques, la biodégradabilité. Lorsque la solubilité dans l'eau est douteuse ou problématique, on devrait mettre la main sur les modes opératoires acceptables auparavant utilisés pour la préparation des solutions aqueuses des produits chimiques visés, les divulguer, puis déterminer expérimentalement la solubilité du produit dans l'eau d'essai. On devrait obtenir et enregistrer d'autres renseignements disponibles tels que la formule développée, la nature et le pourcentage des impuretés notables, la présence d'additifs et leur quantité, le coefficient de partage entre le *n*-octanol et l'eau.

Les produits chimiques à éprouver devraient au moins être de « qualité réactif », à moins que l'on n'exige un essai sur une préparation commerciale ou un produit de « qualité technique » (USEPA, 1994a). À leur réception, on doit en sceller les récipients, puis les coder et les étiqueter. L'information exigée (nom du produit, fournisseur, date de réception, personne chargée des essais, etc.) devrait figurer sur l'étiquette et/ou être enregistrée sur une feuille séparée de données consacrée à l'échantillon, selon ce qui convient le mieux. Les conditions d'entreposage (p. ex. température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. On devrait prélever, étiqueter, transporter et entreposer le ou les échantillons de sédiment contaminé ou de matières particulaires à évaluer après enrichissement selon les instructions (§ 5.1 et 5.2).

6.2 Préparation des mélanges destinés aux essais

Les chercheurs ont utilisé différentes méthodes pour enrichir un sédiment témoin non contaminé d'une ou de plusieurs substances chimiques ou pour diluer des sédiments contaminés ou d'autres déchets particulaires à l'aide de sédiment témoin, en préparation des essais de mesure de la toxicité des sédiments avec le mélange ainsi obtenu (ASTM, 1991a, b, 1994, 1995a et b ; Burton, 1991 ; USEPA, 1994a ; Hoke *et al.*, 1995). La technique et le temps de mélange de même que, ensuite, la période de maturation peuvent influer sur la toxicité du mélange (USEPA, 1994a).

Les méthodes expérimentales (y compris les méthodes d'addition et de mélange, la période et les conditions d'équilibrage) présidant à l'enrichissement des sédiments sont nouvelles, variées et peu uniformisées. Nous ne pouvons donc pas encore recommander de méthode normalisée. Nous suggérons plutôt des pistes, qui ont servi ou que nous estimons sensées, pour enrichir un sédiment destiné à des essais toxicologiques employant des chironomes.

Les rapports d'Environnement Canada (1994, 1995) donnent plus de précisions sur l'enrichissement et l'homogénéisation du sédiment. On devrait les consulter. Les chercheurs qui se proposent d'utiliser dans des essais toxicologiques un ou plusieurs mélanges préparés en laboratoire devraient faire preuve de prudence, en se méfiant : des éventuels problèmes de non-homogénéité de ces mélanges ; des modifications que cela entraîne dans la biodisponibilité et la sorption ; de la non-linéarité éventuelle des réactions toxiques (Nelson *et al.*, 1994).

La méthode d'enrichissement du sédiment dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance ou de la matière d'essai à mélanger au sédiment témoin ou autre. Souvent, on prépare le mélange en prenant une ou plusieurs parties d'une solution mère de produit chimique et en les intégrant, par mélange, dans du sédiment témoin (ASTM, 1991a et 1994 ; USEPA, 1994a). On exprime souvent la concentration dans le sédiment en µg/g ou en mg/kg de poids sec, mais la concentration rapportée au poids humide pourrait être plus utile pour corréler les résultats à la toxicité du sédiment (Burton, 1991). Selon la nature de la substance ou de la matière d'essai et les objectifs de l'essai, on pourrait aussi rapporter les concentrations à la teneur des sédiments en carbone organique (p. ex. pour évaluer la toxicité des composés organiques non polaires) ou à la teneur en sulfures volatils acides (p. ex. pour évaluer la toxicité des métaux) [Di Toro *et al.*, 1990 et 1991 ; ASTM, 1991a et 1994 ; USEPA, 1994a].

Pour préparer des solutions mères, on préfère comme solvant l'eau d'essai (v. § 2.3.4 et 3.4) ; on devrait éviter les autres solvants que l'eau, sauf nécessité absolue. Pour diluer les composés organiques ou autres peu solubles dans l'eau, on peut utiliser un solvant organique miscible dans l'eau pour aider à disperser les composés dans l'eau (ASTM, 1991a et 1994 ; USEPA, 1994a). On a recommandé le triéthylèneglycol en raison de sa faible toxicité pour les organismes aquatiques, sa faible volatilité et sa grande capacité de dissoudre de nombreuses substances organiques (ASTM, 1991a et 1994). On peut utiliser d'autres solvants tels que le méthanol, l'éthanol, le diméthylsulfoxyde ou l'acétone pour préparer les solutions mères de substances organiques, mais ces solvants peuvent contribuer à la toxicité de l'échantillon, modifier les propriétés du sédiment ou s'échapper du milieu d'essai en raison de leur volatilité. On ne devrait pas utiliser de surfactifs (ASTM, 1991a et 1994).

Si on utilise un solvant organique, l'essai doit comporter un témoin constitué de sédiment non contaminé (c'est-à-dire sans solvant ni substance d'essai) et un témoin constitué de sédiment et du solvant. Ce dernier témoin doit renfermer le solubilisant à la concentration maximale où il se trouve dans les mélanges de sédiment et de substance d'essai. Le solvant doit provenir du lot qui a servi à préparer la solution mère (ASTM, 1991a et 1994 ; USEPA, 1994a).

On devrait utiliser les solvants avec parcimonie, puisqu'ils pourraient contribuer à la toxicité du sédiment d'essai. Leur concentration maximale dans le sédiment ne devrait pas influer sur la survie ou la croissance des larves de chironomidés au cours de l'essai. Si on ne connaît pas cette concentration, on devrait effectuer un essai préliminaire, *avec solvant seulement*, à diverses concentrations dans du sédiment témoin, afin de déterminer la concentration-seuil du solvant que l'on envisage d'utiliser dans l'essai définitif.

Le mélange des parties de solution mère de produit(s) chimique(s) d'essai avec du sédiment témoin ou un autre sédiment devrait être homogène. On peut faire le brassage à la main (p. ex. à l'aide d'une spatule ou d'une tige de verre propre) ou mécaniquement (p. ex. Ditsworth *et al.*, 1990). On peut également enduire les parois d'une fiole avec du produit, puis ajouter une suspension aqueuse (c'est-à-dire du sédiment témoin et de l'eau d'essai). On agite ensuite le contenu de la fiole. On peut aussi ajouter un volume mesuré de la solution mère

directement dans une suspension aqueuse du sédiment témoin (ou autre) dans l'eau d'essai, agiter le tout et laisser reposer (EC, 1992a). D'autres méthodes de mélange pourraient se révéler acceptables, à la condition que le produit chimique s'avère uniformément réparti dans le sédiment. Pour chaque variante de l'essai, il faut uniformiser les conditions de brassage, y compris le rapport solution/sédiment, la durée et la température de brassage et de conservation. La durée du brassage du sédiment enrichi devrait assurer la répartition homogène de la substance. Cela peut prendre de quelques minutes à 24 h. Pendant l'opération, on devrait maintenir basse la température afin de réduire au minimum l'altération physico-chimique du mélange et l'activité microbienne. Il est conseillé d'analyser des sous-échantillons du mélange afin de déterminer le degré de brassage et l'homogénéité (Ditsworth *et al.*, 1990 ; USEPA, 1994a).

Pour certaines études, on pourrait devoir ne préparer qu'une concentration d'un mélange donné de sédiment témoin (ou autre) et de produit(s) chimique(s) ou le mélange d'une seule concentration de sédiment contaminé ou de déchet particulaire dans du sédiment témoin ou autre. Par exemple, on pourrait effectuer un essai avec une seule concentration de produit chimique ou de déchet particulaire dans un sédiment non contaminé pour déterminer si cette concentration est toxique pour *C. tentans* ou *C. riparius*. Cet essai pourrait servir à l'application des règlements ou à la recherche.

On devrait ajouter une gamme de concentrations d'un produit chimique à du sédiment témoin ou autre, dans des conditions normalisées, pour chiffrer les paramètres de mesure (p. ex. CL50, CIp, CSEO, CEMO ; v. § 6.5) des mélanges utilisés. Conviendrait aussi un essai avec sédiment témoin enrichi de plusieurs concentrations d'un déchet particulaire donné. Il faut alors au moins cinq concentrations, plus un témoin ; il est recommandé de préparer et d'utiliser de six à huit concentrations (plus un sédiment témoin au moins) pour améliorer la probabilité de cerner chaque paramètre de mesure recherché. On peut se servir d'une suite de dilutions formant une série géométrique, chaque concentration de produit ou de déchet particulaire dans le sédiment étant au moins la moitié de la précédente dans la série (p. ex. 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 mg/kg)[45]. Les dilutions peuvent aussi former des séries logarithmiques (v. annexe H). Pour déterminer l'intervalle convenable des concentrations, on peut effectuer un essai préliminaire, qui en englobera une gamme plus large.

En organisant les essais destinés à évaluer la toxicité de mélanges de substance(s) ou matière(s) dans un sédiment témoin, pour les besoins de l'homologation fédérale ou l'application d'un règlement, il faut prévoir au moins cinq répétitions de chaque concentration à analyser et de chaque sédiment témoin à utiliser dans l'essai. Comme l'emploi d'une gamme de concentrations vise à la fois à déterminer la CL50 (données sur la mortalité) et la CIp (données sur le poids sec), il est recommandé d'utiliser dans l'essai six à huit concentrations plus un ou des témoins. On pourrait réduire le nombre de répétitions par

---

45. Dans les sédiments, la concentration s'exprime normalement en µg/g ou en mg/kg de poids sec ou humide. Dans l'eau de porosité, elle pourrait parfois s'exprimer en µg/L ou en mg/L.

variante ou les supprimer tout à fait si les essais visent à déterminer des intervalles. On pourrait faire de même, selon les écarts prévus entre les enceintes expérimentales affectées à une variante de l'essai, si les essais servent au dépistage à des fins non réglementaires ou à des fins de recherche.

Nous recommandons, conformément à un usage répandu (USEPA, 1994a) de laisser vieillir les mélanges de sédiment enrichi quatre semaines avant d'entreprendre l'essai. Si de nombreuses études ont débuté dans les heures ou les jours qui ont suivi la préparation des mélanges enrichis, ces délais courts et variables pourraient ne pas suffire pour l'équilibrage des constituants du sédiment témoin. En prévoyant un vieillissement constant de quatre semaines avant l'essai toxicologique, on assurerait une certaine uniformisation des comparaisons intra- et interlaboratoires des résultats. Dès sa préparation, on devrait recueillir chaque mélange dans un récipient convenable, sceller ce dernier (sans espace d'air) et le conserver à l'obscurité à 4 ± 2 °C (§ 5.2) pendant quatre semaines avant de l'utiliser.

Selon les objectifs de l'essai, il pourrait être souhaitable de déterminer l'effet des caractéristiques du substrat (p. ex. granulométrie ou teneur en matière organique) sur la toxicité des mélanges de produits chimiques et de sédiment. Par exemple, on pourrait mesurer l'influence de la granulométrie du sédiment sur la toxicité du produit chimique, par des essais parallèles avec plusieurs concentrations, à l'aide d'une série de mélanges du produit chimique dans différentes fractions (c'est-à-dire de granulométrie différente) ou des types différents de sédiment naturel ou artificiel témoin (§ 3.5). De même, on pourrait examiner dans quelle mesure la teneur en matière organique du sédiment peut modifier la toxicité chimique, par des essais parallèles, avec plusieurs concentrations de différents mélanges de produits chimiques et de sédiment préparés avec une série de sédiments témoins enrichis de matière organique. On devrait intégrer dans l'essai, à titre de témoin, chaque fraction ou préparation de sédiment témoin artificiel ou naturel que l'on a employée à la préparation de ces mélanges.

On pourrait devoir mesurer l'effet, sur la survie et le poids des chironomes à la fin de l'essai, d'une ou de plusieurs concentrations de produits chimiques donnés, introduits dans l'enceinte expérimentale sous forme de solutions recouvrant le sédiment. Le mode opératoire de la préparation de ces concentrations pourrait varier selon les objectifs de l'étude. On pourrait, par exemple, ajouter avec soin la ou les solutions d'essai dans des enceintes supplémentaires renfermant une couche de sédiment témoin ou autre (p. ex. prélevé sur le terrain), sans ensuite mélanger ni perturber le sédiment et les solutions d'essai ; ou agiter les solutions d'essai introduites dans les enceintes pendant une période déterminée, en présence du sédiment, avant l'introduction des organismes. Les interactions entre les produits chimiques et le sédiment pourraient différer considérablement selon l'approche suivie et pourraient aboutir à des résultats notablement différents. Pour préparer chaque solution d'essai, on devrait utiliser, sauf indication du contraire, de l'eau d'essai, réglée à 23 ± 1 °C (§ 6.3). Il faut préparer et traiter de même les témoins des échantillons répétés, y compris, le cas échéant, les témoins de(s) solvant(s). Les instructions que nous avons fournies dans la présente section sur l'emploi des solvants autres que

l'eau sont à suivre dans la préparation des témoins renfermant un solvant.

6.3 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution

L'eau de préparation des solutions mères ou des solutions filles et l'eau servant aux essais d'une durée de 10 j en présence de mélanges de sédiment enrichi devraient normalement être de l'eau d'essai non contaminée (v. § 3.4). Cette eau peut être reconstituée ou naturelle. Il n'est pas obligatoire que ce soit l'eau qui a servi à l'élevage des organismes d'essai (v. § 2.3.4). Si on vise un haut degré d'uniformisation, une eau reconstituée, d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ par litre, est recommandée (§ 2.3.4 ; USEPA, 1994a). Par exemple, nous recommandons une eau reconstituée ordinaire dans les cas où on doit comparer et évaluer la toxicité mesurée du mélange de produits chimiques et de sédiment par rapport aux résultats obtenus dans un certain nombre d'installations expérimentales sur les mêmes produits chimiques ou d'autres.

6.4 Observations et mesures expérimentales

Lorsqu'on met l'essai sur pied, on devrait faire la description qualitative de chaque mélange de sédiment enrichi et de l'eau surnageante : couleur, texture, homogénéité apparente du sédiment, couleur et opacité de l'eau surnageante, notamment. Toute modification de l'aspect du mélange ou de l'eau surnageante observée au cours de l'essai ou à la fin est à noter. On devrait mesurer et noter la qualité de chaque mélange de sédiment enrichi (y compris du sédiment témoin) et de l'eau surnageante selon méthode décrite aux § 4.5, 5.2 et 5.5.

Si les capacités de l'analyse l'autorisent, il est recommandé d'analyser les solutions mères, l'eau surnageante, le sédiment entier, l'eau de porosité et les solutions filles (le cas échéant), afin de doser les concentrations et de déterminer si le sédiment a été enrichi de façon satisfaisante. Pour les cas où des dosages sont nécessaires, on devrait au moins prélever des parties aliquotes de l'échantillon à des concentrations forte, moyenne et faible, au début et à la fin de l'essai. On devrait préserver, entreposer et analyser ces prises d'essai en suivant chaque fois des méthodes convenables et éprouvées.

À moins d'avoir de bonnes raisons de croire que les dosages ne sont pas précis, on devrait calculer et exprimer les résultats des essais toxicologiques en concentrations moyennes mesurées à la fois pour le sédiment entier (µg/kg ou mg/kg de poids sec) et l'eau de porosité (µg/L ou mg/L). Si on dose un produit ajouté à l'eau surnageante, on devrait, là aussi, arriver à une concentration moyenne mesurée dans le sédiment entier et l'eau de porosité, mais, en plus, on devrait divulguer les concentrations moyennes mesurées pour les solutions d'essai recouvrant les sédiments (EC, 1992a, 1997a et b).

6.5 Paramètres de mesure et calculs

Les essais employant une gamme de concentrations de mélanges de sédiment enrichi se caractérisent normalement par la CL50 après 10 j et un paramètre de mesure représentant des données sur le poids des organismes (p. ex. la CIp). Nous présentons succinctement les statistiques et les programmes convenant au calcul de ces paramètres dans les pages qui suivent. Dans le § 5.6, nous avons donné des indications sur le calcul et la comparaison des

paramètres de mesure statistiques d'essais effectués avec une seule concentration de mélanges de sédiment enrichi. Aux chercheurs qui veulent en savoir plus sur les statistiques paramétriques ou non paramétriques qui s'appliquent aux paramètres de mesure, il est recommandé de consulter le rapport d'Environnement Canada sur les statistiques utiles à la détermination des paramètres de mesure toxicologiques (EC, 1997d) de même qu'USEPA (1994a et b) ou USEPA/USACE (1994).

6.5.1 Concentration létale médiane (CL50)

Quand on effectue un test employant une gamme de mélanges de sédiment enrichi (§ 6.2), on doit se servir des résultats quantiques sur la mortalité pour calculer la *concentration létale moyenne (CL50)* après 10 j et ses limites de confiance à 95 %. Pour estimer la CL50, on réunit toutes les données sur le taux de mortalité après 10 j observés dans toutes les répétitions de l'expérience et à chaque concentration. Si le taux de mortalité n'est pas d'au moins à 50 % à une concentration donnée, on ne peut pas estimer la CL50. Si une concentration donnée correspond à un taux de mortalité nul (0 %), on utilise cette information. Toutefois, si plusieurs concentrations successives correspondent à autant de taux nuls de mortalité, on ne se sert que de la concentration maximale de cette série pour estimer la CL50 (c'est-à-dire l'effet nul le plus rapproché de la médiane de la distribution des données). De même, si on observait une série de taux de mortalité de 100 % aux concentrations élevées utilisées pour l'essai, on ne se servirait que d'une concentration : la minimale. Ces deux restrictions s'appliquent à toute forme d'analyse statistique et à toute construction graphique manuelle.

Divers programmes informatiques permettent de calculer la CL50. Stephan (1977) a construit un programme pour estimer la CL50 à l'aide des probits, des moyennes mobiles et de la méthode binomiale et il l'a adapté à l'ordinateur personnel compatible IBM. Nous recommandons ce programme en langage BASIC, que l'on peut se procurer sur disquette [46] d'Environnement Canada (adresse donnée dans l'annexe B). On peut utiliser d'autres méthodes informatiques et manuelles satisfaisantes (p. ex. USEPA, 1985a ; Hubert, 1987 ; APHA *et al.*, 1995 ; EC, 1997d). On peut utiliser sur ordinateur PC des programmes employant la méthode élaguée de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1997), mais nous ne les recommandons pas parce que, entre les mains de novices peu sensibilisés aux conséquences de l'élagage des données extrêmes de la relation dose-réponse, ils pourraient donner des résultats divergents (EC, 1997d).

Le programme recommandé de Stephen (1977) permet d'estimer la CL50 et les limites de confiance par chacune des trois méthodes, si l'ensemble de données compte au moins deux taux partiels de mortalité. Si l'on recherche des données lissées ou régulières, les trois méthodes donneront vraisemblablement des résultats semblables, et on devrait préférer et divulguer les résultats de l'analyse par probits. La méthode des probits donne également la pente de la courbe, que l'on devrait communiquer. L'estimation obtenue par la

---

46. Grâce à l'amabilité du Dr Charles E. Stephen (USEPA, Duluth [MN]).

méthode binomiale pouvant différer quelque peu des autres résultats, elle ne devrait servir qu'en dernier recours. Si les résultats ne comprennent pas deux taux partiels de mortalité, on ne peut utiliser que la méthode binomiale pour estimer au mieux la CL50. Cette méthode n'estime pas les limites officielles de confiance. Elle donne plutôt les limites extérieures d'un intervalle dans lequel se trouveraient la CL50 et les véritables limites de confiance.

Il faudrait vérifier la CL50 calculée par l'ordinateur en examinant un diagramme, à l'échelle log-probabilité, des taux de mortalité au jour 10, aux diverses concentrations analysées (APHA *et al.*, 1995 ; EC, 1997d). Il faut résoudre tout écart important entre la CL50 estimée au moyen de ce graphique et la CL50 calculée par ordinateur. Pour cette vérification, on préfère un graphique construit à la main. Un graphique dessiné par l'ordinateur ferait l'affaire s'il était fondé sur des échelles log-probabilité. Si l'introduction des données avait été entachée d'une erreur, le graphique produit par l'ordinateur l'aurait répétée, comme l'analyse mathématique. C'est pourquoi le chercheur devrait vérifier rigoureusement les coordonnées des points sur les graphiques.

La figure 2 est le graphique construit à la main du taux de mortalité en fonction de la concentration pour estimer la CL50. Dans cet exemple hypothétique, on compte 100 organismes (cinq répétitions de 20 organismes, à chaque concentration) ayant fait l'objet d'un essai à chacune des cinq concentrations. La figure se fonde sur des concentrations de 1,8, de 3,2, de 5,6, de 10 et de 18 mg de produit chimique par kilogramme de sédiment, qui provoquent des taux de mortalité de 0, de 20, de 40, de 90 et de 100 % des groupes de larves de chironomidés qui y sont exposés respectivement pendant 10 j. On peut déterminer visuellement la concentration que l'on s'attend à être létale pour la moitié des organismes en repérant le point de la courbe la mieux ajustée qui correspond au taux de 50 % (trait discontinu), puis en descendant de ce point jusqu'à l'axe horizontal pour obtenir la CL50 estimative (5,6 mg/kg). On pourrait construire un graphique semblable avec les données reliant la mortalité à la concentration, à l'aide de la concentration mesurée moyenne (en µg/L ou en mg/L) déterminée à l'analyse de l'eau de porosité (v. § 6.4).

En ajustant une courbe comme celle de la figure 2, on devrait veiller davantage aux points près du taux de mortalité de 50 %. On peut se procurer du papier log-probabilité (« log-probit », comme dans la figure 2) dans les bonnes librairies techniques ou les commander par leur truchement.

Pour l'ensemble régulier de données à l'origine de la figure 2, les programmes informatiques donnent des estimations très semblables à celle de la méthode graphique. Les CL50 (et leurs limites de confiance à 95 %) étaient les suivantes :

Méthode de Stephan (1977)		
• probits	5,58	(4,24 et 7,37)
• moyennes mobiles	5,58	(4,24 et 7,33)
• méthode binomiale	6,22	(entre 1,8 et 10)
Analyse de Hubert par la méthode des probits (1987) :	5,56	(4,28 et 7,21)
TOXSTAT 3.4	5,58	(4,34 et 7,12)
SAS (1988), analyse des probits	5,58	(4,26 et 7,40

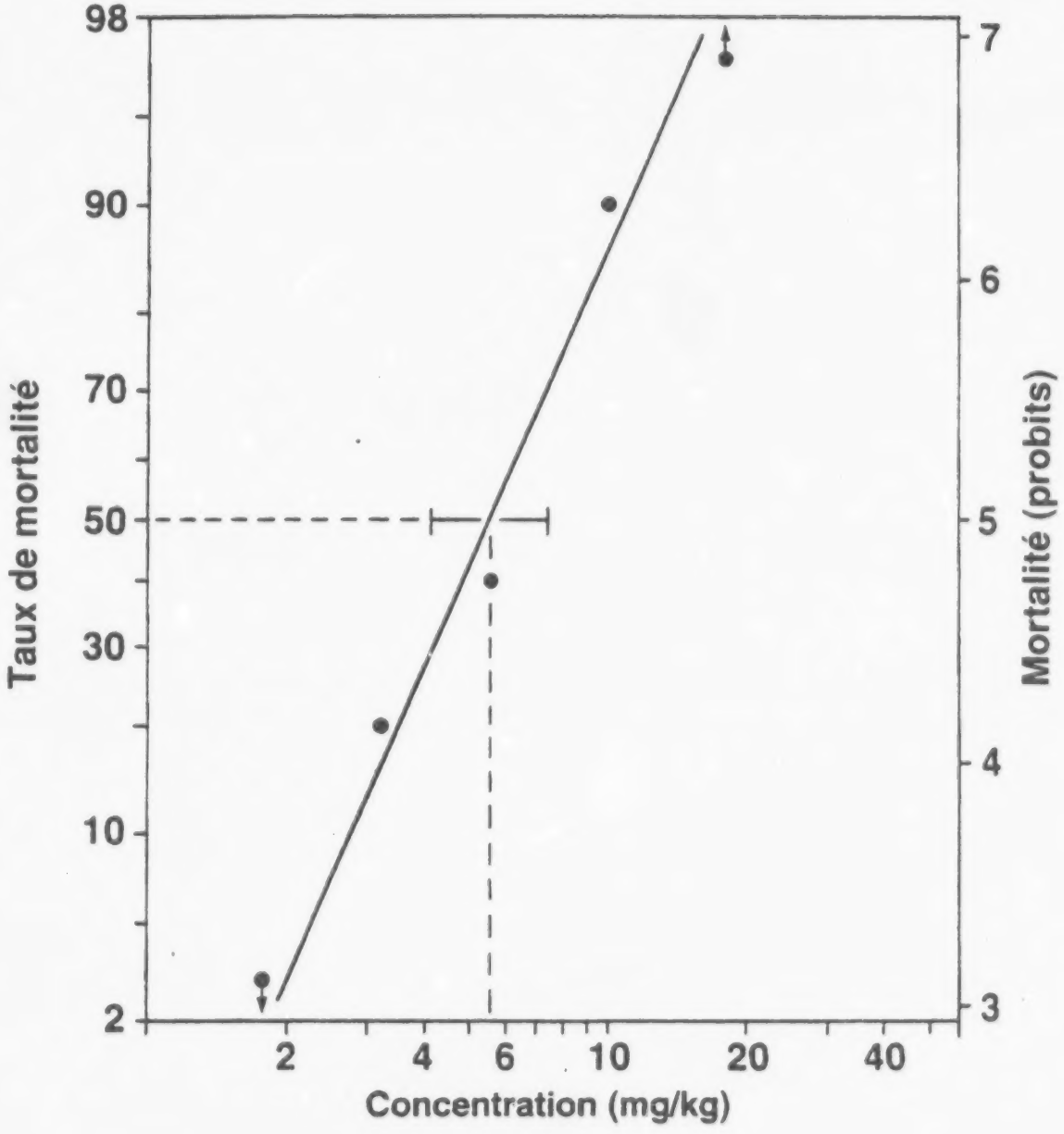


Figure 2. — Estimation de la concentration létale médiane, par établissement du graphique des taux de mortalité sur papier log-probabilité

Si on incluait dans l'étude un témoin du solvant, on devrait comparer statistiquement le poids sec des organismes des échantillons répétés du sédiment témoin renfermant du solvant et du sédiment témoin non contaminé. À cette fin, on peut appliquer le test *t* de Student (§ 5.6.1). Si les poids diffèrent sensiblement entre les deux témoins, on peut seulement utiliser le témoin de solvant comme base de comparaison et pour le calcul des résultats. S'ils ne diffèrent pas, on devrait utiliser les résultats des deux témoins pour évaluer les conditions d'acceptabilité de l'essai et comme base du calcul des résultats (USEPA, 1994a). L'essai est invalide si plus de 30 % des larves de chironomes mises en présence de l'un ou de l'autre des sédiments témoins meurent au cours de l'essai.

6.5.2 Concentration inhibitrice (CIp) [p correspondant à un pourcentage d'effet]

Pour les données sur le poids sec moyen, la CIp (*concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précisé*) est le paramètre statistique recommandé. C'est une estimation quantitative de la concentration causant un pourcentage précisé de réduction du poids sec moyen des organismes d'essai (par exemple, la CI25 et la CI20 représentent respectivement une réduction de 25 et 20 %). C'est le chercheur qui choisit le pourcentage, 25 et 20 % étant les taux les plus utilisés. Toute CIp calculée et publiée doit comprendre ses limites de confiance à 95 %.

Le poids moyen des organismes d'essai se calcule par le poids sec total des larves de chironomidés ayant survécu dans une enceinte donnée, divisé par le nombre d'organismes ayant survécu à la fin de l'essai (§ 4.7). On exclut de l'analyse l'enceinte (assimilée à une répétition) où aucun organisme n'a survécu. On exclut de même la concentration dont toutes les répétitions correspondent à une mortalité totale.

Actuellement, la seule méthode facilement accessible d'estimation de la CIp et de ses limites de confiance à 95 % est la méthode « bootstrap » informatisée (Norberg-King, 1993) dont le programme s'appelle *ICPIN* (USEPA, 1994b). Public, ce programme peut être obtenu de l'USEPA et il fait partie de la plupart des logiciels d'écotoxicologie, y compris TOXSTAT. Les instructions d'origine, de l'USEPA, sont claires, ce qui facilite l'utilisation du programme (Norberg-King, 1993)[47]. Une version antérieure portait le nom de BOOTSTRP.

Pour l'analyse, l'ICPIN n'exige pas un nombre égal de répétions de concentrations différentes. L'estimation de la CIp se fait par lissage des données, dans la mesure nécessaire, puis utilisation des deux données

---

47. Les instructions dans Norberg-King (1993) sèment parfois la confusion sur ce qu'est une « répétition ». Le terme est utilisé de telle façon qu'il s'appliquerait au poids que chaque organisme dans la même enceinte. Ce lapsus ne nuit en rien au bon fonctionnement du programme.

Les progiciels du commerce vendus en 1996 étaient plus déroutants pour l'introduction des données et l'analyse, que le programme d'origine de l'USEPA (Norberg-King, 1993). Certains progiciels étaient rebelles, et les guides très nébuleux. Les progiciels actuels du commerce exigent et livrent généralement une information particulière, selon les spécifications de l'USEPA, qui ne satisfont pas nécessairement aux exigences d'Environnement Canada. Un programme du commerce pourrait être construit pour des ordinateurs personnels assez modernes (depuis 1996) ; l'un deux exigeait assez de mémoire classique (au moins 610 kilo-octets libres) qu'il en restait peu aux autres programmes.

voisines de la CIp choisie (USEPA, 1994b). On ne peut pas calculer la CIp sans les concentrations inférieure et supérieure ; ces deux concentrations devraient exercer un effet suffisamment rapproché de la valeur choisie de *p*, de préférence à moins de 20 % de distance. Pour le moment, le programme n'utilise pas l'échelle logarithmique des concentrations, de sorte que les utilisateurs canadiens doivent introduire les concentrations sous forme logarithmique. Certains progiciels du commerce sont capables, c'est là une de leurs fonctionnalités de base, d'effectuer la transformation logarithmique, mais les chercheurs devraient s'assurer de la conservation de cette fonctionnalité en passant à ICPIN. Ce dernier estime les limites de confiance par une technique spéciale de « bootstrap », parce que les méthodes habituelles ne seraient pas valides. Par cette technique, on effectue de nombreux « rééchantillonnages » des mesures originales. Le chercheur doit en préciser le nombre, qui peut varier de 80 à 1 000. On en recommande au moins 400 ; 1 000 donneraient de bon résultats [48].

Outre la détermination et la publication d'une CIp calculée par ordinateur, on pourrait produire un graphique du pourcentage de réduction du poids sec en fonction du logarithme de la concentration, pour vérifier l'estimation mathématique et fournir une évaluation graphique (visuelle) de la nature des données (EC, 1997d).

Si on incluait dans l'étude un *témoin du solvant*, on pourrait comparer statistiquement le poids des larves de chironomidés survivantes dans les répétitions aux poids dans le témoin utilisant du sédiment non contaminé. On peut alors utiliser le *test t de Student*. Si les poids diffèrent de façon significative entre les deux témoins, on ne peut utiliser que le témoin du solvant comme base de comparaison et du calcul des résultats. Si les résultats sont les mêmes, on devrait utiliser les données des deux témoins pour évaluer l'acceptabilité de l'essai et comme base de calcul des résultats (USEPA, 1994a). Le test est invalide si plus de 30 % des larves de chironomidés de l'un des sédiments témoins meurent au cours de l'essai.

6.5.3 Test d'hypothèse (CSEO et CEMO)

Une autre façon de présenter les résultats de l'essai est de déterminer la *concentration sans effet observé (CSEO)*, la *concentration à effet minimal observé (CEMO)* et la *concentration avec effet de seuil observé (CESO)*. Pour ces essais avec sédiment enrichi, on calcule la CSEO et la CEMO à partir du poids sec moyen des organismes survivants dans chaque répétition (enceinte) du témoin et des diverses concentrations. Pour les calculs, on utilise les données sur l'effet sublétal qui ont servi à estimer la CIp. On exclut de l'analyse la répétition ou la concentration correspondant à la mortalité totale [49].

---

48. Le programme ICPIN possède des points faibles. Sa méthode d'interpolation n'utilise pas les données au mieux et elle est sensible aux particularités des deux concentrations utilisées. Le programme omet d'adopter le logarithme de la concentration, biais qui favoriserait une CIp plus forte. En modifiant la méthode bootstrap, on a pu remédier à un problème de limites de confiance trop étroites. La régression linéaire ou la régression générale estimeraient mieux la CIp et ses limites à 95 % (EC, 1997d), mais on n'a pas mis au point de progiciel standard de régression pour l'écotoxicologie. Les chercheurs devraient rester à l'affût d'un nouveau programme qui leur conviendrait.

49. On peut concevoir une mortalité importante à des concentrations inférieures à celles qui influeraient

Les méthodes statistiques sont expliquées, exemples à l'appui, dans USEPA (1994a et b), USEPA/USACE (1994), Newman (1995), EC (1997d), et dans les progiciels du commerce tels que TOXSTAT (WEST Inc. et Gulley, 1996). Elles débutent par une vérification de la normalité et de l'homogénéité des variances par les *tests de Shapiro-Wilks* et de *Bartlett*. Si les données, originales ou transformées (§ 5.6) satisfont aux deux essais, l'analyse devrait se faire par des méthodes paramétriques.

Comme tests paramétriques, on effectue l'*analyse de la variance (ANOVA)*, puis le *test de Williams*, test de comparaison multiple qui détermine quelles concentrations diffèrent significativement du témoin. Le test de Williams tient compte de l'ordre de la grandeur des concentrations, caractéristique recherchée pour accroître la sensibilité et convenant beaucoup à la plupart des essais toxicologiques (Masters *et al.*, 1991)[50]. Il permet d'estimer l'*écart significatif minimal (ESM)*. C'est la grandeur de l'écart dans les poids moyens qui devrait exister entre les témoins et une concentration d'essai afin de conclure à un effet significatif correspondant à cette concentration. Tout essai sur lequel on publie la CSEO ou la CEMO exige que l'on précise l'ESM. Si l'ESM des poids moyens est supérieur à 25 % du poids moyen des témoins, on peut douter de la validité et de l'utilité des constatations.

Si le nombre de répétitions est inégal, en raison d'une perte accidentelle ou pour d'autres causes, on remplace le test de Williams par le *test t modifié par Dunn-Sidak* ou le *test t corrigé par Bonferroni*.

Si la transformation des données ne satisfait pas aux tests de la conformité et de l'homogénéité, on devrait passer à l'analyse paramétrique, sauf en cas d'écart important de la normalité, ce qui, de toute évidence, ne cadrerait pas avec cette analyse. Les tests paramétriques sont relativement robustes aux non-conformités modérées (v. § 5.6). On devrait aussi effectuer une analyse non paramétrique. La plus sensible des deux analyses (qui donne des concentrations inférieures) doit servir à l'estimation finale de la CSEO et de la CEMO. Dans ce cas, il faut inclure dans le rapport détaillé les éléments suivants :

- les résultats des *tests de Shapiro-Wilks* et de *Bartlett* ;
- un graphique tracé à la main des poids moyens par enceinte, dans lesquels les concentrations sont sous forme logarithmique ;
- les conclusions d'une analyse paramétrique, y compris l'ESM ;
- les conclusions de l'analyse non paramétrique.

L'analyse non paramétrique exige quatre répétitions[51]. Le *test de Shirley* serait la

---

sur le poids moyen. Bien que d'autres méthodes d'analyse puissent quantifier cet effet sur la mortalité, la CL50 est le seul paramètre de mesure de la mortalité qu'il faut publier pour cet essai de mesure de la toxicité des sédiments.

50. Un autre test de comparaison multiple standard, le *test de Dunnett*, est privilégié dans TOXSTAT et dans la plupart des méthodes américaines. Ce n'est pas une façon particulièrement puissante de distinguer les effets, puisqu'il ignore la grandeur des concentrations quand il calcule l'écart significatif minimal (Masters *et al.*, 1991).

51. Cette exigence pourrait empêcher l'estimation de la CSEO et de la CEMO. Un essai pourrait avoir été conçu avec moins de répétitions, principalement

méthode de choix plutôt que l'analyse de variance. À l'instar du test de Williams, il prend en considération le rang des concentrations. Malheureusement, il n'est pas disponible dans la plupart des progiciels statistiques et il n'est pas décrit non plus dans la plupart des manuels. Le *test multiunivoque de Steel* est offert dans la plupart des progiciels statistiques des États-Unis et il pourrait servir, à ce titre, bien qu'il ne tienne pas compte de l'ordre des concentrations. Si le nombre de répétitions n'était pas égal, on devrait utiliser le *test de sommation des rangs de Wilcoxon*. Ces tests sont des outils puissants, pour les données qui ne sont pas normalement distribuées, mais ils seraient moins puissants que les tests paramétriques s'ils étaient utilisés sur des données dont la distribution est normale.

On calcule souvent la *CESO*, moyenne géométrique de la CSEO et de la CEMO, parce qu'elle offre l'avantage de ne constituer qu'un nombre. On devrait publier la CESO, en reconnaissant que c'est une estimation arbitraire d'un seuil d'effet qui pourrait se trouver n'importe où dans la gamme entre la CEMO et la CSEO. Cette valeur est déterminée par les concentrations choisies pour le test. On ne peut estimer aucune limite de confiance pour la CSEO, la CEMO ou la CESO.

---

pour calculer la CIp. Si les résultats devaient se révéler s'écarter de la normalité ou de l'homogénéité, le chercheur ne pourrait pas parachever son analyse par des méthodes non paramétriques.

Rapports à produire

Le rapport d'essai doit mentionner si on s'est écarté des exigences énoncées dans les sections 2 à 6 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. Le lecteur doit pouvoir établir si les conditions et les modes opératoires ayant existé avant et pendant l'essai ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

Dans le § 7.1, nous énumérons les points (renseignements) à intégrer dans le rapport d'essai et, dans le § 7.2, les renseignements à soit intégrer dans le rapport d'essai, soit communiquer séparément dans un rapport général, soit archiver pour au moins cinq années. Certains programmes de surveillance, des protocoles d'essai connexes ou des règlements pourraient exiger de faire figurer dans le rapport d'essai certains des renseignements du § 7.2 (p. ex. des précisions sur les matières analysées ou sur les modes opératoires et les conditions explicites ayant coïncidé avec le prélèvement des échantillons, leur manutention, leur transport et leur entreposage) ou de les reléguer à l'archivage.

À l'égard de certains modes opératoires et conditions communs à une série d'essais systématiques (p. ex. les essais toxicologiques courants de surveillance ou de contrôle de la conformité au règlement) et correspondant aux exigences énoncées dans le présent document, on peut renvoyer à un rapport général ou joindre ce dernier. Dans ce rapport, on expose dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

On doit archiver, au laboratoire, pour au moins cinq ans, les détails se rapportant à la réalisation et aux constatations de l'essai, qui ne sont pas reproduits dans le rapport d'essai ni dans le rapport général, de sorte que l'on peut fournir l'information convenable si l'essai doit faire l'objet d'une vérification (audit). L'information archivée devrait comprendre les renseignements suivants :

- l'enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons prélevés sur le terrain et des autres échantillons qui ont été analysés dans un dessein de surveillance ou d'application des règlements ;
- copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons ;
- les résultats d'analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ne figurant pas dans le rapport de l'essai ;
- les notes d'observation et de mesure en laboratoire enregistrées au cours de l'essai ;
- les notes de laboratoire et les cartes de contrôle portant sur les essais toxicologiques de référence ;
- les dossiers détaillés concernant l'origine des organismes d'essai, la confirmation de leur taxonomie et tous les renseignements utiles sur leur élevage et leur état de santé ;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des appareils.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer ou parafer l'original des feuilles de données.

7.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des renseignements à intégrer dans chaque rapport d'essai.

7.1.1 Substance ou matière d'essai

- Une courte description du type d'échantillon (p. ex. déblai de dragage, sédiment de référence ou sédiment contaminé, prélevé sur le terrain, sédiment témoin) ou le code attribué à l'échantillon par le personnel du laboratoire ;
- Des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ;
- Les dates du prélèvement des échantillons ; la date et l'heure de leur réception au laboratoire.

7.1.2 Organismes utilisés

- L'espèce et l'origine des géniteurs et des organismes d'essai ;
- Le stade larvaire au début de l'essai ;
- Dans le cas de *C. tentans* uniquement, la largeur moyenne de la capsule céphalique et sa fourchette, au début de l'essai ;
- Tout aspect ou traitement inhabituel des organismes avant leur utilisation dans l'essai.

7.1.3 Installations expérimentales

- Les nom et adresse du laboratoire ;
- Le nom de la personne ou des personnes exécutant l'essai.

7.1.4 Eau d'essai

- Le type et l'origine de l'eau ;
- Les caractéristiques mesurées de l'eau, avant le début de l'essai toxicologique et au début.

7.1.5 Méthode expérimentale

- Le nom de la méthode d'essai biologique utilisée (c'est-à-dire conformément au présent document) ;
- Le plan et la description du mode opératoire, s'il est spécial (p. ex. tamisage du sédiment prélevé sur le terrain ; préparation de mélanges de sédiment enrichi ; préparation et emploi de solvant et, dans ce cas, du sédiment témoin renfermant du solvant) ou si c'est une modification de la méthode normalisée ;
- Une courte description de la fréquence des observations et des mesures effectuées au cours de l'essai et de leur type ;
- Le nom des programmes et des méthodes de calcul des paramètres de mesure statistiques.

7.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- Leur plan et leur description, si on s'écarte en tout ou en partie des modes opératoires et des conditions exposés dans le présent document.
- Le nombre d'échantillons discrets par variante ; le nombre d'enceintes (répétitions) attribué à chaque variante de l'expérience ; le nombre et la description des variantes de chaque essai, y compris le

ou les témoins ; les concentrations d'essai (s'il y a lieu) ;

- La hauteur et le volume du sédiment et de l'eau surnageante dans chaque enceinte expérimentale ;
- Le nombre d'organismes par enceinte expérimentale et par variante de l'essai ;
- L'option retenue pour l'essai (c'est-à-dire renouvellement journalier de l'eau ou conditions statiques) ;
- Le régime alimentaire et les rations ;
- L'aération de l'eau surnageante (y compris son débit) ;
- Les dates du début et de la fin de l'essai.
- À l'égard de chaque échantillon, toutes les mesures de la taille granulométrique des particules de sédiment, du pourcentage d'eau, de la teneur en carbone organique total ; le pH et la teneur en ammoniaque de l'eau de porosité ;
- À l'égard d'au moins une enceinte par variante, toutes les mesures de la température et de la teneur en OD dans l'eau surnageante, au début de l'essai et au moins trois fois par semaine par la suite ; toutes les mesures de la conductivité, du pH et de la teneur en ammoniaque dans l'eau surnageante, au début et à la fin de l'essai.

7.1.7 Résultats

- À l'égard de chaque variante, la moyenne ± l'écart-type du pourcentage de larves de chironomidés ayant survécu à l'exposition après 10 j ; la moyenne ± l'écart-type du poids sec des larves survivantes à la fin de l'essai ;
- Le coefficient de variation (CV) du pourcentage moyen de survie et du poids sec individuel moyen dans les divers groupes témoins de chaque répétition, à la fin de l'essai ;
- Toute CL50 (y compris ses limites de confiance à 95 % et, si on l'a calculée, la pente) que l'on a déterminée ;
- Toute CIP (et ses limites de confiance à 95 %) déterminée pour les données sur la croissance (c'est-à-dire le poids sec à la fin de l'essai) ; des précisions concernant la transformation exigée des données et l'indication de la statistique quantitative utilisée ;
- À l'égard d'un essai employant plusieurs concentrations de sédiment enrichi, l'indication selon laquelle les résultats se fondent sur des concentrations nominales ou mesurées d'une substance ou d'une matière donnée ;
- Les résultats de toute détermination de la CL50 après 96 heures (et ses limites de confiance à 95 %) au moyen du toxique ou des toxiques de référence, à l'aide du même lot d'organismes d'essai ainsi que la moyenne géométrique (± 2 écarts-types) relative aux mêmes toxiques de référence et aux mêmes organismes, calculée au laboratoire à la faveur d'essais antérieurs exécutés au moyen des modes opératoires et des conditions décrits dans le présent document ;
- Toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

7.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des renseignements qu'il faut soit faire figurer dans le rapport d'essai ou

dans le rapport général ou, encore, qu'il faut archiver pour au moins cinq années.

7.2.1 Substance ou matière d'essai

- Le nom des préleveurs ou des fournisseurs de l'échantillon ;
- La chaîne de transmission et les fiches d'inscription des échantillons ;
- L'état (p. ex. la température, la conservation à l'obscurité, dans un récipient scellé) de l'échantillon à sa réception et pendant son entreposage.

7.2.2 Organismes d'essai

- Le nom de la personne ayant identifié les organismes et les lignes directrices taxonomiques utilisées pour en confirmer l'espèce ;
- Les antécédents et l'âge des reproducteurs ;
- La description des conditions et des modes opératoires d'élevage (p. ex. installations et appareillage, éclairage, origine et qualité de l'eau, traitement préalable de l'eau, méthode d'échange de l'eau et débit, température de l'eau, nature du substrat et quantité de substrat) ;
- Les méthodes utilisées pour compter, manipuler, trier, transférer et tamiser les animaux ; les méthodes utilisées pour en déterminer le taux de mortalité, l'état, l'aspect et le comportement ;
- L'origine et la composition de la nourriture, les méthodes utilisées pour la préparer et la conserver, les méthodes d'alimentation, la fréquence des repas et les rations données.

7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux

- La description de l'expérience antérieure du laboratoire dans les méthodes biologiques de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de larves de chironomidés ;
- La description des systèmes d'éclairage et de fourniture de l'air comprimé ainsi que de régulation de la température dans l'installation d'essai ;
- La description des enceintes expérimentales et des couvercles, le cas échéant ;
- La description de l'appareillage utilisé pour distribuer et renouveler l'eau surnageante dans les enceintes expérimentales, si on a choisi de renouveler journellement l'eau ;
- La description des méthodes utilisées pour nettoyer ou rincer l'appareillage expérimental.

7.2.4 Sédiment témoin et eau d'essai

- Les méthodes de traitement préalable du sédiment témoin (p. ex. tamisage, sédimentation des fines particules tamisées, préparation et vieillissement du sédiment s'il est artificiel) et de l'eau d'essai (p. ex. filtration, stérilisation, reconstitution et vieillissement, si l'eau est reconstituée, réglage de la température, débit et durée d'aération).
- La nature et la quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau ;
- Les conditions et la durée d'entreposage du sédiment et de l'eau avant emploi ;

7.2.5 Méthode expérimentale

- Les modes opératoires utilisés pour le mélange ou les autres manipulations des sédiments d'essai avant leur emploi ; l'intervalle de temps entre la préparation et l'utilisation dans les essais ;
- Le mode opératoire utilisé pour la préparation des solutions mères et/ou filles de produits chimiques ; la description et la concentration de tout solvant utilisé ;
- Les méthodes utilisées (avec citations) pour l'analyse chimique de la matière d'essai (sédiment et eau de porosité) et de l'eau d'essai, y compris des précisions concernant la prise de parties aliquotes, la préparation des prises d'essai et leur entreposage, avant l'analyse chimique ;
- L'utilisation et la description des essais préliminaires ou des essais visant à déterminer des intervalles de concentrations.

7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La mesure de l'intensité de l'éclairage au-dessus de la surface de l'eau des enceintes expérimentales ;
- Une déclaration concernant l'aération de l'eau surnageante des enceintes avant et durant l'essai ; le débit de l'aération et le mode d'aération ;
- Le compte rendu de toute interruption de l'aération des enceintes durant l'essai en conditions statiques et des dosages connexes de l'OD ;
- La description du mode opératoire et du débit de renouvellement de l'eau surnageante ;
- L'aspect de chaque échantillon ou mélange d'échantillons et de l'eau surnageante dans les enceintes ; les modifications d'aspect observées durant l'essai ;
- Les résultats de tout autre dosage (p. ex. des contaminants, des sulfures volatils acides, de la demande biochimique en oxygène, de la demande chimique en oxygène, du carbone minéral total, de la capacité d'échange cationique, du potentiel d'oxydo-réduction, du sulfure d'hydrogène de l'eau de porosité, de l'ammoniaque de l'eau de porosité) effectué avant et pendant l'essai sur la matière d'essai (y compris le sédiment témoin et de référence) et le contenu des enceintes ; y compris les analyses du sédiment entier, de l'eau de porosité et de l'eau surnageante ;
- Toute autre observation ou analyse faite sur la matière d'essai (y compris des échantillons du sédiment témoin ou de référence), p. ex. traces d'animaux, données qualitatives et quantitatives concernant la macrofaune indigène ou les détritus, les analyses géochimiques, etc. ;
- Les résultats des dosages de produits chimiques présent dans les solutions filles du toxique de référence.

7.2.7 Résultats de l'essai

- Les résultats de tout essai visant à déterminer un intervalle de concentrations ;
- Si elle est mesurée, la largeur de la capsule céphalique des organismes survivant à la fin de l'essai, calculée pour chaque variante (moyenne ± l'écart-type), ainsi que les résultats de toute comparaison statistique ;

- Une carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les antécédents des essais toxicologiques au moyen du ou des toxiques de référence ;
- La représentation graphique des données ;
- L'original des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signé et daté par les membres du personnel de laboratoire effectuant les essais et les analyses connexes.

Travaux cités

ACTON, A.B., G.G.E. SCUDDER, « The Zoogeography and Races of *Chironomus* (= *Tendipes*) *tentans* FAB », *Limnologica, 8*: 83-92 (1971).

ANKLEY, G.T., D.A. BENOIT, R.A. HOKE, E.N. LEONARD, C.W. WEST, G.L. PHIPPS, V.R. MATTSON, L.A. ANDERSON, « Development and Evaluation of Test Methods for Benthic Invertebrates and Sediments: Effects of Flow Rate and Feeding on Water Quality and Exposure Conditions », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25*: 12-19 (1993).

ANKLEY, G.T., D.A. BENOIT, J.C. BALOGH, T.B. REYNOLDSON, K.E. DAY, R.A. HOKE, « Evaluation of Potential Confounding Factors in Sediment Toxicity Tests with Three Freshwater Benthic Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 13*, 627-635 (1994).

APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation), « Toxicity », Part 8000, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19e éd., APHA, AWWA, and WEF, Washington, DC (1995).

ARMSTRONG, F.A.J., D.P. SCOTT, « Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers », *J. Fish. Res. Board Can., 31*: 1881-1885 (1974).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates », E1383-90, p. 1-20 dans : 1991 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04, ASTM, Philadelphie, PA (1991a).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing », E1391-90, p. 1105-1119 dans : 1991 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04, ASTM, Philadelphie, PA (1991b).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates », E1383-94, p. 1196-1225 dans : 1994 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04, ASTM, Philadelphie, PA (1994).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Test Methods for Measuring the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates », E1706-95, p. 1204-1285 dans : 1995 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.05, ASTM, Philadelphie, PA (1995a).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing », E1706-95, p. 835-855 dans : *1995 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.05*, ASTM, Philadelphie, PA (1995b).

BAUDO, R., J.P. GIESY, H. MUNTAU, *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-place Pollutants*, 405 p., Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI (1990).

BBA/IVA, « International Toxicity Ring-test on Sediment-dwelling *Chironomus riparius*. Protocol for the Toxicity Ring-test of Two Pesticides to the Sediment Dwelling Larvae of *Chironomus riparius* », BBA/IVA *ad hoc* Working Group on Sediment Toxicity Tests, BBA, Braunschweig, Allemagne (1994).

BECKER, D.S., G.N. BIGHAM, « Field Validation of the Amphipod and Chironomid Freshwater Toxicity Tests », SETAC Platform Session #416, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX [rapport inédit] (1993).

BECKER, D.S., C.D. ROSE, G.N. BIGHAM, « Comparison of the 10-day Freshwater Sediment Toxicity Tests Using *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* », *Environ. Toxicol. Chem.*, *14*: 2089-2094 (1995).

BEDARD, D., « Sediment Bioassay Development: Addressing the Pros and Cons », p. 471-474 dans : *Proc., Technology Transfer Conf. No. 10, Vol. 1*, November 20, 1989, Toronto, ON (1989).

BEDARD, D., H. ALI, « Evaluation of the 10-day Sediment Toxicity Test Using the Midge (*Chironomus tentans*): the Effect of Different Water:Sediment Ratios on Biological Endpoints and Water Quality », rapport final, octobre 1996, Ontario Ministry of Environment and Energy, Etobicoke, ON (1996).

BEDARD, D., A. HAYTON, D. PERSAUD, « Ontario Ministry of the Environment Laboratory Sediment Biological Testing Protocol », rapport n° ISBN 0-7729-9924-4, août 1992, Queen's Printer, Toronto, ON (1992).

BENOIT, D.A., G.T. ANKLEY, « Methods for Conducting Life-cycle Sediment Toxicity Tests with *Chironomus tentans* Using the Newly Developed Sediment Testing Intermittent Renewal (STIR) System », SETAC Platform Session #420, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX (1993).

BENOIT, D.A., G.L. PHIPPS, G.T. ANKLEY, « A Sediment Testing Intermittent Renewal System for the Automated Renewal of Overlying Water in Toxicity Tests with Contaminated Sediments », *Water Res., 27 (9)*: 1403-1412 (1993).

BROUWER, H., T. MURPHY, L. MCARDLE, « A Sediment-contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum* », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 1353-1358 (1990).

BROWN, A.F., D. PASCOE, « Studies on the Acute Toxicity of Pollutants to Freshwater Macroinvertebrates - 5. The Acute Toxicity of Cadmium to Twelve Species of Predatory

Macroinvertebrates », *Arch. Hydrobiol. 114*: 311-319 (1988).

BURTON, G.A. « Assessing the Toxicity of Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 1585-1627 (1991).

BURTON, G.A., Jr., coord.., *Sediment Toxicity Assessment*, 457 p., Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI (1992).

BURTON, G.A., Jr., C.G. INGERSOLL, « Evaluating the Toxicity of Sediments », dans : *The ARCS Assessment Guidance Document*, rapport EPA/905-B94/002, United States Environmental Protection Agency, Chicago, IL (1994).

BURTON, G.A., Jr., T.J. NORBERG-KING, C.G. INGERSOLL, D.A. BENOIT, G.T. ANKLEY, P.V. WINGER, J. KUBITZ, J.M. LAZORCHAK, M.E. SMITH, E. GREER, F.J. DWYER, D.J. CALL, K.E. DAY, P. KENNEDY, M. STINSON, « Interlaboratory Study of Precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* Freshwater Sediment Toxicity Assays », *Environ. Toxicol. Chem., 15*: 1335-1343 (1996).

CAIRNS, M.A., A.V. NEBEKER, J.H. GAKSTATTER, W.L. GRIFFIS, « Toxicity of Copper-Spiked Sediments to Freshwater Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 3*: 435-445 (1984).

CALL, D.J., L.T. BROOKE, G.T. ANKLEY, D.A. BENOIT, C.W. WEST, R.A. HOKE, « A Short-term Method for Estimating the Toxicity of Solid Phase Sediment to *Chironomus tentans* », 61 p., Ébauche de rapport préparé pour la United States Environmental Protection Agency, Washington, DC (1993a).

CALL, D.J., K. LIBER, L.T. BROOKE, « The *Chironomus tentans* Survival and Growth Bioassay: A Study of the Effect of Reduced Larval Growth Upon the Following Generation and an Application of the Bioassay in Evaluating Sediment Quality », 69 p. + annexes. Rapport final préparé par le Lake Superior Research Institute for the United States Army Corps of Engineers, septembre 1993, Vicksburg, MA (1993b).

CCREM (Canadian Council of Resource and Environment Ministers / Conseil canadien des ministres des ministres des ressources et de l'environnement), « Recommandations pour la qualité des eaux au Canada », Groupe de travail sur les lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, CCREM, Environnement Canada, Ottawa, ON (1987).

CHAPMAN, P.M., R.N. DEXTER, S.F. CROSS, D.G. MITCHELL, « A Field Trial of the Sediment Quality Triad in San Francisco Bay », NOAA Tech. Mem. NOS OMA 25, National Oceanic and Atmospheric Administration, Rockville, MD (1986).

CHAPMAN, P.M., R.N. DEXTER, E.R. LONG, « Synoptic Measures of Sediment Contamination, Toxicity and Infaunal Community Composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay », *Marine Ecol., 37*: 75-96 (1987).

CHAPMAN, P.M., E.A. POWER, R.N. DEXTER, H.B. ANDERSEN, « Evaluation of Effects Associated with an Oil Platform, Using the Sediment Quality Triad », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 407-424 (1991).

COFFMAN, W.P., « Chironomidae », chapitre 22 dans : *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*, 441 p., R.W. Merritt et K. W. Cummins (coord.), 2e édition, Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, IA (1984).

CRANSTON, P.S., F. REISS, « The Larvae of Chironomidae (Diptera) of the Holarctic Region - Key to subfamilies », dans : *Chironomidae of the Holarctic Region, Keys and Diagnoses, Part 1 - Larvae*. 457 p. T. Wiederholm (coord.), Entomologica Scandinavica Supplement No. 19 (1983).

CREDLAND, P.F., « A New Method for Establishing a Permanent Laboratory Culture of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) », *Freshwater Biol., 3*: 45-51 (1973a).

CREDLAND, P.F., « The Taxonomic Status of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus thummi* Kieffer (Diptera: Chironomidae) », *J. Natural History, 7*: 209-216 (1973).

CURRY, L., « A study of the Ecology and Taxonomy of Freshwater Midges (Diptera Tendipedidae) of Michigan with Special Reference to Their Role in the "Turnover" of Radioactive Substances in the Hydrosol », p. 106-149, rapport 2, Atomic Energy Commission and National Institutes of Health, Central Michigan University, Department of Biology, Mount Pleasant, MI (1962).

DAY, K.E., R.S. KIRBY, T.B. REYNOLDSON, « Sexual Dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigen): Impact on Interpretation of Growth in Whole Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 35-39 (1994).

DAY, K.E., B.J. DUTKA, K.K. KWAN, N. BATISTA, T.B. REYNOLDSON, J.L. METCALFE-SMITH, « Correlations Between Solid-phase Microbial Screening Assays, Whole Sediment Toxicity Tests with Macroinvertebrates and *In-situ* Benthic Community Structure », *J. Great Lakes Res., 21*: 192-206 (1995a).

DAY, K.E., S. KIRBY, T.B. REYNOLDSON, « The Effect of Manipulations of Freshwater Sediments on Responses of Benthic Invertebrates in Whole Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 1333-1343 (1995b).

DE GROOT, A.J., K.H. ZSCHUPPE, « Contribution to the Standardization of the Methods of Analysis for Heavy Metals in Sediments », *Rapp. P.-v. Reun. cons. Int. Explor. Mer., 181*: 111-122 (1981).

DI TORO, D.M., J.H. MAHONY, D.J. HANSEN, K.J. SCOTT, M.B. HICKS, S.M. MAYR, M. REDMOND, « Toxicity of Cadmium in Sediments: the Role of Acid Volatile Sulfides », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 1487-1502 (1990).

DI TORO, D.M., C.S. ZARBA, D.J. HANSEN, W.J. BERRY, R.C. SWARTZ, C.E. COWAN, S.P. PAVLOU, H.E. ALLEN, N.A. THOMAS, P.R. PAQUIN, « Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic Chemicals Using Equilibrium Partitioning », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 1541-1583 (1991).

DITSWORTH, G.R., D.W. SCHULTS, J.K.P. JONES, « Preparation of Benthic Substrates for Sediment Toxicity Testing », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 1523-1529 (1990).

DODGE, E.E., T.L. THEIS, « Effect of Chemical Speciation on the Uptake of Copper by *Chironomus tentans* », *Environ. Sci. Technol., 13*: 1287-1288 (1979).

DOUGLAS, W.S., A. MCINTOSH, J.C. CLAUSEN, « Toxicity of Sediments Containing Atrazine and Carbofuran to Larvae of the Midge *Chironomus tentans* », *Environ. Toxicol. Chem., 12*: 847-853 (1993).

DWYER, F.J., C.J. INGERSOLL, N.E. KEMBLE, « Use of Standardized Formulated Sediment in Toxicity Tests », SETAC Platform Session #275, 14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem., 14-18 nov. 1993, Houston, TX [rapport inédit] (1993).

EC (Environnement Canada), « Biological Test Method: Acute Lethality Test Using *Daphnia* sp. », Conservation et protection, Ottawa (Ont.), rapport EPS 1/RM/11, 57 p. (1990a).

EC (Environnement Canada), « Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence », Conservation et protection, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/12, 91 p. (1990b).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens », Conservation et protection., Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/26, 99 p. (1992a).

EC (Environnement Canada), « Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (*Photobacterium phosphoreum*) », Conservation et protection, Ottawa (Ont.), rapport EPS 1/RM/24, 61 p. (1992b).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia* », Conservation et protection, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/21, 78 p. (1992c).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule », Conservation et protection, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/22, 72 p. (1992d).

EC (Environment Canada), « Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars », Conservation and Protection, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/27, 97 p. (1992e).

EC (Environnement Canada), « Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/29, 139 p. (1994).

EC (Environnement Canada), « Document d'orientation : sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/30, 58 p. (1995).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments », Service de la protection de

l'environnement, Ottawa (Ont.), rapport EPS 1/RM/33 (1997a).

EC (Environnement Canada), « Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment Using Estuarine or Marine Polychaete Worms (*Polydora cornuta* or *Boccardia proboscidea*) », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), rapport EPS x/xx/xx, en préparation (1997b).

EC (Environnement Canada), « Guidance Document on the Interpretation and Application of Data for Environmental Toxicology », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), rapport EPS 1/RM/ 34, en préparation (1997c).

EC (Environnement Canada), « Guidance Document on Statistical Methods to Determine Endpoints of toxicity Tests », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), rapport EPS 1/RM/xx, en préparation (1997d).

EISENHART, C., M.W. HASTAY, W.A. WALLACE, *Techniques of Statistical Analysis*, chapitre 15, McGraw-Hill Book Co., New York, NY (1947).

GAUSS, J.D., P.E. WOODS, R.W. WINNER, J.H. SKILLINGS, « Acute Toxicity of Copper to Three Life Stages of *Chironomus tentans* as Affected by Water Hardness Alkalinity », *Environ. Pollut. (Series A), 37:* 149-157 (1985).

GIESEY, J.P., R.L. GRANEY, J.L. NEWSTED, C.J. ROSIU, A. BENDA, R.G. KREIS, Jr., F.J. HORVATH, « Comparison of Three Sediment Bioassay Methods Using Detroit River Sediments », *Environ. Toxicol. Chem., 7*: 483-498 (1988).

GIESY, J.P., C.J. ROSIU, R.L. GRANEY, « Benthic Invertebrate Bioassays with Toxic Sediment and Pore Water », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 233-248 (1990).

GREEN, D.W.J., K.A. WILLIAMS, D. PASCOE, « Studies on the Acute Toxicity of Pollutants to Freshwater Macroinvertebrates - 2. Phenol », *Arch. Hydrobiol. 103*: 75-82 (1985).

GREEN, D.W.J., K.A. WILLIAMS, D. PASCOE, « Studies on the Acute Toxicity of Pollutants to Freshwater Macroinvertebrates - 4. Lindane », *Arch. Hydrobiol. 106*: 263-273 (1986).

GOWER, A.M., P.J. BUCKLAND, « Water Quality and the Occurrence of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) in a Stream Receiving Sewage Effluent » *Freshwater Biol., 8*: 153-164 (1978).

HAMILTON, M.A., R.C. RUSSO, R.V. THURSTON, « Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays », *Environ. Sci. Technol., 11*: 714-719 (1977).

HARRAHY, E.A., W.H. CLEMENTS, « The Effects of a Mixture of Heavy Metals in Sediment on *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) », SETAC Platform Session #505, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX (1993).

HOKE, R., « Development of a Standard Protocol for *Chironomus tentans* », p. 387-392 dans : *Proceedings, Tiered Testing Issues for Freshwater and Marine Sediments*, 16-18 septembre 1992, United States Environmental

Protection Agency, Washington, DC (1992).

HOKE, R.A., P.A. KOSIAN, G.T. ANKLEY, A.M. COTTER, F.M. VANDERMEIDEN, G.L. PHIPPS, E.J. DURHAN, « Check Studies with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* in Support of the Development of a Sediment Quality Criterion for Dieldrin », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 435-443 (1995).

HUBERT, J.J., « PROBIT2: a Microcomputer Program for Probit Analysis », Dept. Mathematics and Statistics, Univ. Guelph, Guelph, ON [rapport inédit] (1987).

INGERSOLL, C.G., M.K. NELSON, « Testing Sediment Toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera) », p. 93-109 dans : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, W.G. Landis et W.H. van der Schalle (coord). 13e volume, ASTM STP 1096, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1990).

INGERSOLL, C.G., F.J. DWYER, T.W. MAY, « Toxicity of Inorganic and Organic Selenium to *Daphnia magna* (Cladocera) and *Chironomus riparius* (Diptera) », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1171-1181 (1990).

INGERSOLL, C.G., G.T. ANKLEY, D.A. BENOIT, E.L. BRUNSON, G.A. BURTON, F.J. DWYER, R.A. HOKE, P.F. LANDRUM, T.J. NORBERG-KING, P.V. WINGER, « Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants Using Freshwater Invertebrates: A Review of Methods and Applications », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 1885-1894 (1995).

JOHANNSEN, O.A., « Aquatic Diptera. III. Chironomidae: Subfamilies Tanypodidae, Diamesinae and Orthocladiinae », *Memoir Cornell Univ. Agric. Exper. Station, 205*: 3-84 (1937a).

JOHANNSEN, O.A., « Aquatic Diptera. IV. Chironomidae: Subfamily Chironominae », *Memoir Cornell Univ. Agric. Exper. Station, 210*: 3-56 (1937b).

KEMBLE, N.E., W.G. BRUMBAUGH, E.L. BRUNSON, F.J. DWYER, C.G. INGERSOLL, D.P. MONDA, D.F. WOODWARD, « Toxicity of Metal-contaminated Sediments from the Upper Clark Fork River, MT to Aquatic Invertebrates in Laboratory Exposures », *Environ. Toxicol. Chem., 13*, 1985-1997 (1994).

KIKNADZE, I.I., A.I. SHILOVA, I.E. KERKIS, I. KERKIS, I.A. SHOBANOV, N.I. ZELENTSOV, L.P. GREBENUK, A.G. ISTOMINA, V.A. PRASOLOV, « Karyotypes and Morphology of Larvae of Tribe Chironomini », *Science*, 114 p., Académie des sciences de l'URSS, division de Sibérie, Novosibirsk (1991).

LAMBERTI, G.A., J.W. MOORE, « Aquatic Insects as Primary Consumers », p. 164-195, dans : V.H. Resh et D.M. Rosenberg (coord.), *The Ecology of Aquatic Insects*, Praeger Publishers, New York, NY (1984).

LIBER, K., D.J. CALL, T.D. DAWSON, F.W. WHITEMAN, T.M. DILLON, « Effects of *Chironomus tentans* Larval Growth Retardation on Adult Emergence and Ovipositing Success: Implications for Interpreting Freshwater Sediment Bioassays », *Hydrobiologia, 323*: 155-167 (1996).

LYDY, M.J., K.A. BRUNER, D.M. FRY, S.W. FISHER, « Effects of Sediment and the Route of Exposure on the Toxicity and Accumulation of Neutral Lipophilic and Moderately Water Soluble Metabolizable Compounds in the Midge, *Chironomus riparius* », p. 140-164 dans : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, W.G. Landis et W.H. van der Schalle (coord.), 13e volume, ASTM STP 1096, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1990).

LYDY, M.J., J.T. ORIS, P.C. BAUMANN, S.W. FISHER, « Effects of Sediment Organic Carbon Content on the Elimination Rates of Neutral Lipophilic Compounds in the Midge (*Chironomus riparius*) », *Environ. Toxicol. Chem.*, *11*: 347-356 (1992).

MCCAHON, C.P., D. PASCOE, « Culture Techniques for Three Freshwater Macroinvertebrate Species and Their Use in Toxicity Tests », *Chemosphere*, 17 (12): 2471-2480 (1988).

MAKI, A.W., « Modifications of Continuous Flow Test Methods for Small Aquatic Organisms », *Prog. Fish. Cult.*, *39*: 172-174 (1977).

MALLOCH, J.R., « A Preliminary Classification of Diptera, Exclusive of Pupipara, Based upon Larval and Pupal Characters, with Keys to Imagines in Certain Families », Part I, Bull. Illinois State Lab. Natural History, Vol XII, Urbana, IL (1917).

MASTERS, J.A., M.A. LEWIS, D.H. DAVIDSON, R.D. BRUCE, « Validation of a Four-day *Ceriodaphnia* Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis », *Environ. Toxicol. Chem.*, *10*: 47-55 (1991).

MEARNS, A.J., R.C. SWARTZ, J.M. CUMMINS, P.A. DINNEL, P. PLESHA, P.M. CHAPMAN, « Interlaboratory Comparison of a Sediment Toxicity Test Using the Marine Amphipod, *Rhepoxynius abronius* », *Marine Environ. Res.*, *19*: 13-37 (1986).

MILANI, D., K.E. DAY, D.J. MCLEAY, R.S. KIRBY, « Recent Intra- and Interlaboratory Studies Related to the Development and Standardization of Environment Canada's Biological Test Methods for Measuring Sediment Toxicity Using Freshwater Amphipods (*Hyalella azteca*) or Midge Larvae (*Chironomus riparius*), rapport technique préparé par l'Institut national re recherche sur les eaux, Burlington (Ont.) pour la Section du développement et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, ON (1996).

MOSHER, R.G., R.A. KIMERLE, W.J. ADAMS, « MIC Environmental Assessment Method for Conducting 14-day Partial Life Cycle Flow-through and Static Sediment Exposure Toxicity Tests with the Midge *Chironomus tentans* », rapport ES-82-M-10, 12 p., 17 août 1982, Monsanto Industrial Chemicals Co., Environmental Sciences Section, St. Louis, MO (1982).

NEBEKER, A.V., M.A. CAIRNS, J.H. GAKSTATTER, K.W. MALUEG, G.S. SCHUYTEMA, D.F. KRAWCZYK, « Biological Methods for Determining Toxicity of Contaminated Freshwater Sediments to Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem.*, *3*: 617-630 (1984).

NEBEKER, A.V., S.T. ONJUKKA, M.A. CAIRNS, « Chronic Effects of Contaminated Sediment on *Daphnia magna* and *Chironomus tentans* »,

Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41: 574-581 (1988).

NELSON, M.K., P.F. LANDRUM, G.A. BURTON, S.J. KLAINE, E.A. CRECELIUS, T.D. BYL, D.C. GOSSIAUX, V.N. TSYMBAL, L. CLEVELAND, C.G. INGERSOLL, G. SASSON-BRICKSON, « Toxicity of Contaminated Sediments in Dilution Series with Control Sediments », *Chemosphere*, 27: 1789-1812 (1994).

NEWMAN, M.C., *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL (1955).

NORBERG-KING, T.E. « Instar Development in *Chironomus tentans* », communication privée, United States Environmental Protection Agency, Environ. Res. Lab. - Duluth, Duluth, MN (1994b).

NWRI (National Water Research Institute / Institut national de recherche sur les eaux), « Standard Operating Procedures: Culture and Sediment Bioassay Methods for *Chironomus riparius*, *Hexagenia* spp., *Hyalella azteca*, and *Tubifex tubifex* », K. Day, 30 septembre 1992, ébauche, Direction de la recherche sur les cours d'eau, Centre canadien des eaux intérieures, Environnement Canada, Burlington, ON [rapport inédit] (1992).

ORMEROD, S.J., P. BOOLE, C.P. MCCAHON, N.S. WEATHERLEY, D. PASCOE, R.W. EDWARDS, « Short-term Experimental Acidification of a Welsh Stream: Comparing the Biological Effects of Hydrogen Ions and Aluminum », *Freshwater Biol., 17*: 341-356 (1987).

OTHOUDT, R.A., J.P. GIESY, K.R. GRZYB, D.A. VERBRUGGE, R.A. HOKE, J.B. DRAKE, D. ANDERSON, « Evaluation of the Effects of Storage Time on the Toxicity of Sediments », *Chemosphere, 22*: 801-807 (1991).

PAINE, M.D., C.A. MCPHERSON, « Phase IV Studies of 10-day Tests for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (Division du milieu marin, PE, CP) et le GITA par EVS Consultants Ltd., North Vancouver, BC (1991).

PASCOE, D., K.A. WILLIAMS, D.W.J. GREEN, « Chronic Toxicity of Cadmium to *Chironomus riparius* Meigen - Effects Upon Larval Development and Adult Emergence », *Hydrobiologia, 175*: 109-115 (1989).

PASCOE, D., A.F. BROWN, B.M.J. EVANS, C. MCKAVANAGH, « Effects and Fate of Cadmium During Toxicity Tests with *Chironomus riparius* - the Influence of Food and Artificial Sediment », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19*: 872-877 (1990).

PASCOE, D., D.E. GOWER, C.P. MCCAHON, M.J. POULTON, A.J. WHILES, J. WULFHORST, « Behavioural Responses to Pollutants - Application in Freshwater Bioassays », p. 246-254 dans : *Bioindicators and Environmental Management*, D.W. Jeffrey et B. Madden (coord.), Academic Press, New York, NY (1991).

PHIPPS, G.L., V.R. MATTSON, G.T. ANKLEY, « The Relative Sensitivity of Three Freshwater Benthic Macroinvertebrates to Ten Contaminants », *Arch. Environ. Toxicol. Chem., 28: 281-286 (1995).*

PINDER, L.C.V., « The Larvae of Chironomidae (Diptera) of the Holarctic Region - Introduction », dans *Chironomidae of the Holarctic Region.*

Keys and Diagnoses. Part 1 - Larvae. 457 p. T. Wiederholm (coord.), Entomologica Scandinavica Supplement No. 19 (1983).

PITTINGER, C.A., D.M. WOLTERING, J.A. MASTERS, « Bioavailability of Sediment Sorbed and Aqueous Surfactants to *Chironomus riparius* (Midge) », *Environ. Toxicol. Chem., 8*: 1023-1033 (1989).

POWLESLAND, C., J. GEORGE, « Acute and Chronic Toxicity of Nickel to Larvae of *Chironomus riparius* (Meigen) », *Environ. Pollut. (Series A)*, 42: 47-64 (1986).

RASMUSSEN, J.B., « The Life History, Distribution and Production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a Prairie Pond », *Hydrobiologia, 119*: 65-72 (1984).

REYNOLDSON, T.B., K.E. DAY, C. CLARKE, D. MILANI, « Effect of Indigenous Animals on Chronic End Points in Freshwater Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 973-977 (1994).

REYNOLDSON, T.B., R.C. BAILEY, K.E. DAY, R.H. NORRIS, « Biological Guidelines for Freshwater Sediment Based on BEnthic Assessment of SedimenT (the BEAST) Using a Multivariate Approach for Predicting Biological State », *Aust. J. Ecol., 20*: 198-219 (1995).

RIZA, « Chironomid, Chronic Toxicity Test on Larvae in Spiked Sediment », par VAN DE GUCHTE, C., E.M.M. GROOTELAAR, J.L. MASS, août 1993, 20 p. Ébauche de ligne directrice de l'OCDE concernant les essais sur produits chimiques, Organisation de coopération et de développement économiques, Institut d'aménagement des eaux intérieures et de traitement des eaux usées, Riza, Pays-Bas (1993).

ROCCHINI, R.J., M.J.R. CLARK, A.J. JORDAN, S. HORVATH, D.J. MCLEAY, J.A. SERVIZI, A. SHOLUND, H.J. SINGLETON, R.G. WATTS, R.H. YOUNG, « *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish* », B.C. Ministry of Environment, Victoria, BC (1982).

SADLER, W.O., « Biology of the Midge *Chironomus tentans* Fabricius and Methods of its Propagation », *Memoirs Cornell Univ. Agric. Exper. Station, 173*: 1-25 (1935).

SAAS (SAS Institute Inc.), « SAS procedures guide, Release 6.03, *et* Additional SAS/STAT procedures, Release 6/03 (SAS Technical Report P-179), SAS Institute Inc., Cary, NC (1988).

SCHUBAUER-BERIGAN, M.K., G.T. ANKLEY, « The Contribution of Ammonia, Metals and Nonpolar Organic Compounds to the Toxicity of Sediment Interstitial Water from an Illinois River Tributary », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 925-939 (1991).

SCHUBAUER-BERIGAN, M.K., P.D. MONSON, C.W. WEST, G.T. ANKLEY, « Influence of pH on the Toxicity of Ammonia to *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus* », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 713-717 (1995).

SERGY, G., « Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection, C & P, DOE », Rapport d'Environnement Canada Report, Protection de l'environnement, Conservation et

protection, Edmonton, AB [rapport inédit] (1987).

SIBLEY, P.K., D.G. DIXON, D.R. BARTON, « Comparison of Pore Water, Bulk Sediment, and Elutriate Toxicity Tests for Determining the Toxicity of Sediments Exposed to BKME to Benthic Macroinvertebrates », SETAC Platform Session #414, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX (1993).

SLY, P.G., W.J. CHRISTIE, « Factors Influencing Densities and Distributions of *Pontopoereia hoyi* in Lake Ontario », *Hydrobiologia, 235/236*: 321-352 (1992).

SOKAL, R.R., F.J. ROHLF, *Biometry*, W.H. Freemen and Co., San Francisco, CA (1969).

STEEL, R.G.D., J.H. TORRIE, *Principles and Procedures of Statistics*, McGraw-Hill Book Co., New York, NY (1980).

STEPHAN, C.E., « Methods for Calculating an LC50 », p. 65-84 dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer et J.L. Hamelink (coord.), ASTM STP 634, American Society For Testing and Materials, Philadelphie, PA (1977).

SUEDEL, B.C., J.H. RODGERS JR., « Development of Formulated Reference Sediments for Freshwater and Estuarine Sediment Testing », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 1163-1175 (1994a).

SUEDEL, B.C., J.H. RODGERS JR., « Responses of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* to Particle Size Distribution and Organic Matter Content of Formulated and Natural Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 1639-1648 (1994b).

SUEDEL, B.C., J.H. RODGERS JR., P.A. CLIFFORD, « Bioavailability of Fluoranthene in Freshwater Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 12*: 155-165 (1993a).

SUEDEL, B.C., E. DEAVER, J.H. RODGERS JR., « Reducing Uncertainty in Laboratory Sediment Toxicity Tests », SETAC Platform Session #508, 14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem., 14-18 nov. 1993, Houston, Texas (1993b).

SUEDEL, B.C., E. DEAVER, J.H. RODGERS, JR., « Formulated Sediment as a Reference and Dilution Sediment in Definitive Toxicity Tests », *Arch. Envir. Contam. Toxicol., 30*: 47-52 (1996).

SUTER, G.W. II, A.E. ROSEN, E. LINDER, D.F. PARKHURST, « Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures », *Environ. Toxicol. Chem., 6*: 793-809 (1987).

TAYLOR, E.J., S.J. MAUND, D. PASCOE, « Toxicity of Four Common Pollutants to the Freshwater Macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda) », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 21*: 371-376 (1991a).

TAYLOR, E.J., S.J. MAUND, D. PASCOE, « Evaluation of a Chronic Toxicity Test Using Growth of the Insect *Chironomus riparius* Meigen », p. 343-352 dans : *Bioindicators and Environmental Management*, D.W. Jeffrey et B. Madden (coord.), Academic Press, NY (1991b).

TAYLOR, E.J., S.J. BLOCKWELL, S.J. MAUND, D. PASCOE, « Effects of Lindane on the Life-cycle of a Freshwater Macroinvertebrate *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 24*: 145-150 (1993).

TOMASOVIC, M., F.J. DWYER, I.E. GREER, C.G. INGERSOLL, « Recovery of Known-age *Hyalella azteca* (Amphipoda) from Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 1177-1180 (1995).

TOPPING, M.S., « Ecology of Larvae of *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in Saline Lakes in Central British Columbia », *Can. Entomol., 193*: 328-338 (1971).

TRUSSELL, R.P. « The Percent Un-ionized Ammonia in Aqueous Ammonia Solutions at Different pH Levels and Temperatures », *J. Fish. Resh. Board Can.*, 29: 1505-1507 (1972)

TOWNES, H.K., « The Nearctic Species of Tendipedini (Diptera, Tendipedidae (= Chironomidae)) », *Amer. Midland Naturalist, 34*: 1-206 (1945).

TOWNSEND, B.E., S.G. LAWRENCE, J.F. FLANNAGAN, « *Chironomus tentans* (Fabricius) », p. 109-126 dans : *Manual for the Culture of Selected Freshwater Invertebrates*, Canad. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. No. 54, Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, ON (1981).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms », rapport EPA/600/ 4-85/013, W.H. Peltier et C.I. Weber (coord.), USEPA, Cincinnati, OH (1985a).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms », rapport EPA/600/4-85/014, W.B. Horning et C.I. Weber (coord.), 162p., USEPA, Cincinnati, OH (1985b).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Ambient Water Quality Criteria for Ammonia - 1984 », rapport EPA 440/5-85-001, USEPA, Washington, DC (1985c)

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms », 2e éd., rapport EPA/600/4-89/001, 248 p., USEPA, Cincinnati, OH (1989).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Standard Operating Procedure for the Culture of *Chironomus tentans* », J. Denny et K. Mead (coord.), ébauche du 29 oct. 1991, 14 p., Environ. Res. Lab., USEPA, Duluth, MN (1991a).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms », rapport EPA-600/4-90/027, USEPA, Cincinnati, OH (1991b).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms », rapport EPA-600/4-90/027F, Office of Research and Development,

Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati, Ohio (1993).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates », rapport EPA 600/R-94/024, 133 p., USEPA, Duluth, MN (1994a).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms », 3e éd., rapport EPA/600/4-91-002, 341 p., USEPA, Cincinnati, OH (1994b).

USEPA/USACE (United States Environmental Protection Agency/United States Army Corps of Engineers), « Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Waters of the United States - Testing Manual (Draft) », rapport EPA-823-B-94-002, préparé par USEPA/USACE, Washington, DC (1994).

USINGER, R.L., « *Aquatic Insects of California, With Keys to North American Genera and California Species* », 508 p., Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, CA (1963).

WENTSEL, R., A. MCINTOSH, G. ATCHISON, « Sublethal Effects of Heavy Metal Contaminated Sediment on Midge Larvae (*Chironomus tentans*) », *Hydrobiologia, 56 (2)*: 153-156 (1977a).

WENTSEL, R., A. MCINTOSH, W.P. MCCAFFERTY, G. ATCHINSON, V. ANDERSON, « Avoidance Response of Midge Larvae (*Chironomus tentans*) When Exposed to Sediments Containing Heavy Metals », *Hydrobiologia, 55*: 171-175 (1977b).

WENTSEL, R., A. MCINTOSH, P.C. MCCAFFERTY, « Emergence of the Midge *Chironomus tentans* When Exposed to Heavy Metal Contaminated Sediments », Hydrobiologia, 57: 195-196 (1978).

WEST, Inc., D.D. GULLEY, « Toxstat® 3.5 », Western EcoSystems Technology, Inc., Cheyenne, WY, [Logiciel et guide d'utilisation. WEST, Inc. 203, Central Ave., Cheyenne, WY 82001, USA] (1996).

WEST, C.W., V.R. MATTSON, E.N. LEONARD, G.L. PHIPPS, G.T. ANKLEY, « Comparison of the Relative Sensitivity of Three Benthic Invertebrates to Copper-contaminated Sediments from the Keweenaw Waterway », *Hydrobiologia, 262*: 57-63 (1993).

WHITEMAN, F.W., G.T. ANKLEY, M.D. KAHL, D.M. RAU, M.D. BALCER, « Evaluation of Interstitial Water as a Route of Exposure for Ammonia in Sediment Tests with Benthic Macroinvertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 15*: 794-801 (1996).

WILLIAMS, D.A., « A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control », *Biometrics, 27*: 103-118 (1971).

WILLIAMS, D.A. « The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control », *Biometrics, 28*: 519-532 (1972).

WILLIAMS, K.A., D.W. GREEN, D. PASCOE, « Studies on the Acute Toxicity of

Pollutants to Freshwater Macroinvertebrates - 1. Cadmium », *Arch. Hydrobiol. 102*: 461-471 (1985).

WILLIAMS, K.A., D.W. GREEN, D. PASCOE, « Studies on the Acute Toxicity of Pollutants to Freshwater Macroinvertebrates - 3. Ammonia », *Arch. Hydrobiol. 106*: 61-70 (1986a).

WILLIAMS, K.A., D.W.J. GREEN, D. PASCOE, D.E. GOWER, « The Acute Toxicity of Cadmium to Different Larval Stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its Ecological Significance for Pollution Regulation », *Oecologia (Berlin), 70*: 362-366 (1986b).

WILLIAMS, K.A., D.W.J. GREEN, D. PASCOE, D.E. GOWER, « Effect of Cadmium on Oviposition and Egg Viability in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 38: 86-90 (1987).

ZUMWALT, D.C., F.J. DWYER, I.E. GREER, C.G. INGERSOLL, « A Water-renewal System that Accurately Delivers Small Volumes of Water to Exposure Chambers », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 1311-1314 (1994).

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (juillet 1997)

Gouvernement fédéral (Environnement Canada)

N. Bermingham
Centre Saint-Laurent
Montréal

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal

S. Blenkinsopp
Centre de technologie environnementale
Edmonton (Alb.)

C. Boutin
Centre national de la recherche sur la faune
Hull

A. Chevrier
Division du milieu marin
Hull

A. Cook
District de Terre-Neuve
St. John's

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

K. Doe
Direction de la conservation de l'environnement
Moncton (N.-B)

G. Elliott
Laboratoire d'écotoxicologie
Edmonton (Alb.)

P. Jackman
Direction de la conservation de l'environnement
Moncton (N.-B.)

R. Kent
Direction de l'évaluation et de l'interprétation
Hull

N. Kruper
Laboratoire d'écotoxicologie
Edmonton (Alb.)

R. Legault
Centre Saint-Laurent
Montréal

D. MacGregor
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

D. Moul
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

W.R. Parker
Région de l'Atlantique
Dartmouth (N.-É.)

L. Porebski
Division du milieu marin
Hull

D. Rodrigue
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

A. Steenkamer
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

G. van Aggelen
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

R. Watts
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

P. Wells
Région de l'Atlantique
Dartmouth (N.-É.)

W. Windle
Direction de l'évaluation des produits chimiques commerciaux
Hull

S. Yee
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

Gouvernement fédéral (Pêches et Océans Canada)
D. Cyr
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Qc)

Gouvernement fédéral (Ressources naturelles Canada)
B. McAffee
CANMET
Ottawa

Gouvernement fédéral (Commission de contrôle de l'énergie atomique)
P. Thompson
Division de la radioprotection
Ottawa

Provinces
S. Abernethy
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

C. Bastien
Ministère de l'Environnement et de la Faune
Sainte-Foy (Qc)

D. Bedard
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

J. Lee
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

M. Mueller
Environnement Ontario
Etobicoke (Ont.)

C. Neville
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

D. Poirier
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

Annexe B

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull
K1A 0H3

Région de l'Atlantique
15e étage, Queen Square
45 Alderney Drive
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
14e étage
105, rue McGill
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Région de l'Ontario
2e étage
4905, rue Dufferin
Downsview
M3H 5T4

Région de l'Ouest et du Nord
Pièce 210, Twin Atria n° 2
4999, 98e Avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon[52]
224, rue Esplanade
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7M 3H7

52. Pour le calcul de la CL50, on peut obtenir, contre une disquette formatée, un programme en BASIC de la Section de la toxicologie aquatique du Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, 2645 Dollarton Highway, North Vancouver (C.-B.) V7H 1V2.

Annexe C

Variantes des méthodes d'élevage des chironomes, décrites dans les méthodes canadiennes, américaines et européennes

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent. On peut y accéder comme suit :

USEPA (1984) : Nebeker *et al.* (1984). Exposé des méthodes d'élevage et d'essai alors utilisées par le Laboratoire de recherche environnementale de l'USEPA à Corvallis (Oregon) pour déterminer la toxicité de sédiments contaminés d'eau douce à l'égard d'un certain nombre d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans*.

UWCC (1988) : McCahon et Pascoe (1988). Exposé des techniques utilisées en 1988 au collège de l'université du pays de Galles à Cardiff (Royaume-Uni), pour l'élevage d'un certain nombre d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. riparius*, en vue d'essais de mesure de la toxicité aiguë et chronique.

USFWS (1990) : Ingersoll et Nelson (1990). Expsé des modes opératoires d'élevage de *C. riparius* et d'*Hyalella azteca* et de l'emploi de ces organismes dans les essais de mesure de la toxicité des sédiments alors utilisés par le National Fisheries Contaminant Research Center du Fish and Wildlife Service des États-Unis, à Columbia (MO). Certains détails sont tirés d'Ingersoll *et al.* (1990).

ASTM (1991) : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials (à Philadelphie [PA]), pour la réalisation d'essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans* et *C. riparius*. Publiée de nouveau dans les années ultérieures, y compris en 1994. V. ASTM (1991a) et ASTM (1994), dans les travaux cités.

USEPA (1991a) : Ébauche (29 octobre 1991) du mode opératoire normalisé de l'élevage de *C. tentans*, alors utilisé par l'Environmental Research Laboratory de l'USEPA à Duluth (MN). V. USEPA (1991a) dans les travaux cités.

NWRI (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits), utilisés en 1992 pour l'élevage de *C. riparius* et d'autres invertébrés dulcicoles et leur emploi dans les essais toxicologiques, par K. Day, de l'Institut national de recherche sur les eaux, de la Direction de la recherche sur les cours d'eau, du Centre canadien des eaux intérieures d'Environnement Canada à Burlington (Ont.). V. NWRI (1992) dans les travaux cités.

OME (1992) : Bedard *et al.* (1992). Exposé des méthodes de laboratoire alors utilisées par la Direction des ressources hydriques du ministère de l'Environnement de l'Ontario pour l'élevage des invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans*, et leur emploi dans des essais de mesure de la toxicité des sédiments en conditions statiques. Ces méthodes ont été conçues pour permettre la comparaison directe des résultats de dosages biologiques de la toxicité d'un sédiment et des résultats de mesures de la bioaccumulation, effectués en parallèle, à l'aide d'une seule espèce à la fois, avec des larves de *C. tentans*, des nymphes d'éphéméroptères (*Hexagenia limbata*) et des têtes-de-boule.

USEPA (1992) : Synthèse de l'information trouvée dans Hoke (1992) et de l'annexe A d'USEPA (1994a), représentant les réponses de 11 laboratoires à un questionnaire envoyé par l'Office of Science and Technology de l'USEPA et l'Office of Research and Development, de Washington, sur les modes opératoires qu'ils utilisent pour l'élevage de *C. tentans* ou de *C. riparius* en vue des essais de mesure de la toxicité des sédiments.

RIZA (1993) : Ébauche du mode opératoire de l'élevage de *C. riparius* et de la réalisation d'essais de mesure de la toxicité des sédiments, mis au point par l'Institut de l'aménagement des eaux intérieures et du traitement

des eaux usées (RIZA, Lelystad, Pays-Bas) et soumis à l'examen de l'OCDE pour servir de ligne directrice de cette organisation pour les essais sur certains produits chimiques. V. RIZA (1993) dans les travaux cités.

USEPA (1993) : Call *et al.* (1993a). Ébauche inédite d'une méthode pour l'élevage de *C. tentans* et l'emploi de cette espèce dans des essais de mesure de la toxicité des sédiments, rédigée pour et par l'USEPA.

BBA/IVA (1994) : Méthode utilisée pour un essai de comparaison d'envergure internationale utilisant des pesticides et *C. riparius*. V. BBA/IVA (1994) dans les travaux cités.

Sheffield (1994) : Modes opératoires normalisés inédits, utilisés par C. Naylor et ses collègues du département des sciences animales et végétales de l'université de Sheffield, à Sheffield (Royaume-Uni).

USEPA (1994a) : Méthodes publiées d'élevage de *C. tentans* et d'autres invertébrés dulcicoles et de mesure de la toxicité des sédiments, mises au point par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger). V. USEPA (1994a) dans les travaux cités.

1. Origine du stock de géniteurs

Document [a]	Espèce	Origine première des géniteurs
USEPA (1984)	*C. tentans*	n.i. [b]
UWCC (1988)	*C. riparius*	n.i.
USFWS (1990)	*C. riparius*	n.i.
ASTM (1991)	*C. tentans* *C. riparius*	source naturelle d'eau douce, autre laboratoire ou un fournisseur commercial
USEPA (1991a)	*C. tentans*	oothèques d'autres laboratoires
NWRI (1992)	*C. riparius*	élevage de laboratoire (C. Ingersoll)
OME (1992)	*C. tentans*	élevages de l'université de Toronto (N. Collins, R. Baker) et de l'université de l'État du Michigan (J. Giesy)
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	n.i. (sources diverses, selon le laboratoire)
RIZA (1993)	*C. riparius*	oothèques d'autres laboratoires ou population sauvage
USEPA (1993)	*C. tentans*	source d'eau douce naturelle ou autre laboratoire
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	n.i.
Sheffield (1994)	*C. riparius*	autre laboratoire du Royaume-Uni
USEPA (1994a)	*C. tentans*	autre laboratoire, fournisseur commercial ou population naturelle d'une région non polluée [c]

a. Voir la page précédente pour obtenir la référence exacte.
b. Non indiqué.
c. On évitera d'obtenir des organismes de populations sauvages, à moins d'avoir montré qu'elles peuvent se croiser avec des populations actuelles de laboratoire.

2. Récipients d'élevage, volume d'eau et nombre d'organismes par récipient au début de l'expérience

Document	Espèce	Type de récipient [a]	Volume d'eau (L)	Nbre d'organismes au début de l'expérience
USEPA (1984)	*C. tentans*	aquarium de verre de 10 L	n.i. [b]	2 oothèques
UWCC (1988)	*C. riparius*	plastique, 4 L (17 cm × 17 × 17)	1,3	10 cordons d'œufs éclos
USFWS (1990)	*C. riparius*	plastique (30 cm × 30 × 30)	3	au moins 3 oothèques
ASTM (1991)	*C. tentans*,	aquarium de verre, de 3 à 19 L	n.i. [c]	n.i.
	C. riparius	plastique (30 cm × 30 × 30)	3	au moins 3 oothèques
USEPA (1991a)	*C. tentans*	réservoir de 36 cm × 21 × 26	6 à 8	3 oothèques écloses
NWRI (1992)	*C. riparius*	aquarium de verre de 20 L	n.i. [d]	3 oothèques écloses
OME (1992)	*C. tentans*	aquarium de 21 L (40 cm × 20 × 25)	8 [d]	250 larves du 2[e] stade
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	aquarium de 1 à 80 L	1 à 30	50 à 800 [e]
RIZA (1993)	*C. riparius*	aquarium de plastique	3 à 5	quelques oothèques (p. ex. 5)
USEPA (1993)	*C. tentans*	aquarium de verre de 19 L (36 cm × 21 × 26)	7,5	2 ou 3 masses d'œufs écloses
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	n.i. [f]	n.i.	2 à 4 masses d'œufs
Sheffield (1994)	*C. riparius*	plastique (23 cm × 12 × 8)	1,0	100 larves, de moins de 24 h
USEPA (1994a)	*C. tentans*	aquarium de verre de 19 L (36 cm × 21 × 26)	7,5	150 à 200 larves [h]

a. Tous les récipients d'élevage sont couverts d'un fin grillage pour empêcher que les adultes ne s'échappent après leur émergence.
b. Non indiqué.
c. Eau ajoutée jusqu'à une profondeur de 45 cm.
d. Eau ajoutée jusqu'à une profondeur d'environ 10 cm.
e. Oothèques ou larves de moins de 24 h.
f. Eau ajoutée jusqu'à une profondeur de plusieurs centimètres.
g. On dépose une série de petites boîtes dans une grande cage à couvercle de verre pour empêcher les adultes de s'échapper.
h. Cinq masses d'œufs fourniront le nombre convenable de larves pour entreprendre un nouvel élevage.

3. Origine et dureté de l'eau, méthode de renouvellement de cette dernière dans les élevages

Document	Espèce	Origine de l'eau	Dureté de l'eau (mg/L)	Méthode de renouvellement
USEPA (1984)	*C. tentans*	n.i. [a]	n.i.	RC ou RI (partiel, une fois par semaine)
UWCC (1988)	*C. riparius*	rob. déchl.	n.i.	n.i.
USFWS (1990)	*C. riparius*	puits	283	RI (environ 3 volumes par jour)
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	puits, eau de surface, rob. déchl. [e] ou reconst. [f]	facultative	RI (25 à 30 %/semaine) ou RC
USEPA (1991a)	*C. tentans*	eau de surface filtrée	n.i.	RC chronométrée (1 volume/jour) ou RI (50 % à tous les 2 ou 3 jours)
NWRI (1992)	*C. riparius*	rob. déchl. filtrée	119 à 137	RI (pour compenser les pertes dues à l'évaporation)
OME (1992)	*C. tentans*	rob. déchl.	144	RI (20 % à toutes les 2 semaines)
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	rob. déchl. (3), puits (5), lac. (1), reconst. (1)	douce à très dure	RI (8) ou RC (2)
RIZA (1993)	*C. riparius*	reconst.	210	RI (pour compenser les pertes dues à l'évaporation)
USEPA (1993)	*C. tentans*	origines diverses	facultative	RC (au moins 1 volume par jour) ou RI (1 volume à tous les 4 à 7 jours)
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	puits, déchl., reconst. [g]	n.i.	RI (pour compenser les pertes dues à l'évaporation)
Sheffield (1994)	*C. riparius*	reconst. [g]	n.i.	RI (pour compenser les pertes dues à l'évaporation)
USEPA (1994a)	*C. tentans*	puits, de surface, rob. déchl. [e], reconst. [h]	facultative	RI ou RC [i]

a. Non indiqué.
b. Renouvellement continu.
c. Renouvellement intermittent.
d. Eau de robinet de la ville, déchlorée.
e. On ne devrait utiliser l'eau déchlorée qu'en dernier recours, puisque la déchloration est souvent incomplète.
f. Eau reconstituée.
g. Une recette est fournie pour la préparation d'une eau reconstituée convenable (« Elendt M7 », Sheffield, 1994 ; « Elendt M4 ou M7 », BBA/IVA, 1994).
h. Une recette est fournie pour la préparation d'une eau reconstituée convenable, d'une dureté de 90 à 100 mg/L.
i. On recommande le renouvellement de l'eau d'élevage, à raison de l'addition d'au moins un volume par jour. On devrait remplacer le volume d'eau surnageante au moins une fois par semaine, par siphonnement.

4. Température, aération et éclairage au cours de l'élevage

Document	Espèce	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
USEPA (1984)	*C. tentans*	20	oui si RI[a]	phot. de 16 h[b]
UWCC (1988)	*C. riparius*	18 à 20	oui	éclairage naturel
USFWS (1990)	*C. riparius*	20 ± 2	débit lent (env. 2 bulles/s)	phot. de 16 h ; 269 à 538 lux
ASTM (1991)	*C. tentans*	20 à 23	débit lent, si RI	phot. de 16 h ; 538 lux
	C. riparius	20 à 22	débit lent, si RI	phot. de 16 h ; 538 lux
USEPA (1991a)	*C. tentans*	23	maintient de l'OD à plus de 5 mg/L	phot. de 16 h ; fluoresc.[c] ; 330 lux
NWRI (1992)	*C. riparius*	23 ± 1	débit lent	n.i.[d]
OME (1992)	*C. tentans*	20 ± 2	continu	phot. de 16 h ; fluoresc.
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	19 à 25	oui (débit modéré)	phot. de 16 h ; 500 à 1 300 lux
RIZA (1993)	*C. riparius*	20 ± 1	oui (débit modéré)	phot. de 16 h[e]
USEPA (1993)	*C. tentans*	23	probablement oui si RI	phot. de 16 h
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	20	oui	phot. de 16 h ; 1 000 lux
Sheffield (1994)	*C. riparius*	20 ± 2	débit lent	phot. de 16 h ; fluoresc.[c]
USEPA (1994a)	*C. tentans*	23	oui, si en conditions statiques ou RI	phot. de 16 h ; 500 à 1 000 lux

a. Renouvellement intermittent.
b. Photopériode de 16 heures.
c. Tubes fluorescents, éclairage vertical.
d. Non indiqué.
e. Intensité non critique.

5. Substrats d'élevage des larves de chironomidés

Document	Espèce	Description du substrat	Quantité de substrat
USEPA (1984)	*C. tentans*	Cerophyll[MC] (fournit le substrat et la nourriture)	100 à 200 mg/aquarium [a]
UWCC (1988)	*C. riparius*	paillis homogénéisé de cellulose [b]	épaisseur de 3 cm par aquarium
USFWS (1990)	*C. riparius*	sable d'une granulométrie moyenne d'environ 0,5 mm	couche mince
ASTM (1991)	*C. tentans*	pâte homogénéisée de serviettes de papier brun	épaisseur de 3 cm par aquarium
	C. riparius	feuilles de céréales moulues (substrat et nourriture)	200 à 300 mg par aquarium
USEPA (1991a)	*C. tentans*	pâte homogénéisée de serviettes de papier blanc	500 mL de pâte par aquarium
NWRI (1992)	*C. riparius*	sable de silice (lavé à fond)	1,5 à 2 cm de profondeur par aquarium
OME (1992)	*C. tentans*	sable de silice fin (lavé à fond)	1,6 L par aquarium
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	serviettes de papier non blanchi, 7 labos ; serviettes de papier blanchi, 1 labo ; sable, 2 labos	n.i. [c]
RIZA (1993)	*C. riparius*	sédiment stérile provenant d'une station non polluée [d]	environ 150 g (humide) par aquarium
USEPA (1993)	*C. tentans*	serviettes de papier blanchi ou non blanchi, ou sable	environ 150 mL de pâte par aquarium
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	sable de silice	épaisseur d'environ 0,5 à 1 cm par aquarium
Sheffield (1994)	*C. riparius*	sable	épaisseur d'environ 2 cm par aquarium
USEPA (1994a)	*C. tentans*	sable de silice ou pâte de serviettes de papier	environ 150 mL de pâte par aquarium

a. Au début, on ajoute 100 mg, à l'éclosion des œufs, puis, de nouveau, trois jours plus tard. Ensuite, on ajoute 200 mg, deux fois par semaine.
b. On homogénéise une feuille de papier filtre Whatman n° 1 dans 350 mL d'eau, puis on ajoute 1 L d'eau.
c. Non indiqué.
d. Il faut éliminer la microfaune par passage au tamis à mailles de 500 µm. On peut irradier le sédiment.

6. Alimentation durant l'élevage

Document	Espèce	Aliments utilisés	Quantité [a]	Fréquence des repas
USEPA (1984)	*C. tentans*	Cerophyll[MC]	100 à 200 mg [b]	2 fois par semaine
UWCC (1988)	*C. riparius*	Tetramin[MC] pour poisson, finement moulu	300 mg	journellement
USFWS (1990)	*C. riparius*	mélange de Cerophyll, de *S. capricornutum* à volonté et de nourriture pour chien Hartz[MC] Dog Treats [c]	300 mg [c]	journellement
ASTM (1991)	*C. tentans*	Cerophyll et/ou flocons d'aliment pour poissons	diverses [d]	2 fois par jour
	C. riparius	conformément à USFWS (1990) [c]	300 mg [c]	journellement
USEPA (1991a)	*C. tentans*	Tetrafin[MC] pour poissons rouges, moulu	suspension de 5 mL	journellement
NWRI (1992)	*C. riparius*	flocons d'aliment pour poisson Nutrafin[MC] moulus	200 à 500 mg [e]	journellement
OME (1992)	*C. tentans*	Cerophyll et *Tetra Conditioning Food*[MC]	suspension de 5 à 20 mL [f]	diverse [f]
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	divers (Tetramin[MC], Nutrafin[MC], LCT et algues, luzerne et Tetrafin[MC])	diverses	3 à 7 fois par semaine
RIZA (1993)	*C. riparius*	divers (p. ex. Tetramin[MC] ou Aquariaan[MC])	diverses [g]	1 à 3 fois par semaine [g]
USEPA (1993)	*C. tentans*	Tetrafin[MC], pour poissons rouges, moulu	300 mg	journellement
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	Tetramin[MC], pour poissons, moulu	250 mg	journellement
Sheffield (1994)	*C. riparius*	Tetramin[MC], pour poissons, moulu	100 mg	3 fois par semaine
USEPA (1994a)	*C. tentans*	Tetrafin[MC], pour poissons rouges, moulu	300 mg	journellement

a. Quantité d'aliment distribuée dans chaque récipient d'élevage.

b. À l'éclosion des œufs (jour 0) et, de nouveau au jour J3, 100 mg de Cerophyll plus, facultativement, 10 mg d'aliment pour poissons Tetra[MC] en poudre, déposés dans l'aquarium ; 200 mg de Cerophyll (plus 10 % de Tetra) ajouté deux fois par semaine par la suite.

c. Pour établir un élevage, on ajoute une fois du Cerophyll (300 mg), en même temps que l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*, à volonté. Ensuite, on ajoute journellement 300 mg d'une suspension d'aliment pour chien Hartz Dog Treats.

d. Selon le nombre de larves et leur taille. Dans les nouveaux élevages, au plus 0,5 mL d'une suspension de 1 g de flocons secs d'aliment pour poissons, mélangés dans 10 mL d'eau d'élevage, puis réfrigérés.

e. Jusqu'à l'âge de 5 jours, on distribue aux larves 0,2 à 0,3 g par aquarium ; par la suite, 0,4 à 0,5 g.

f. On prépare (selon un rapport 3/2) une fine suspension de poudre de Cerophyll et de Tetra. Au début, on donne aux larves de 10 à 20 mL de cette suspension, puis 5 mL à tous les deux jours. La ration et l'intervalle entre les repas sont réglés en fonction de la croissance.

g. Aux larves du premier stade, environ 500 mg, une seule fois ; à celles du 2[e] stade, environ 100 mg trois fois par semaine ; à celle des 3[e] et 4[e] stades, 500 mg, trois fois par semaine.

Annexe D

Variantes du mode opératoire des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide de chironomes, décrites dans les méthodes canadiennes, américaines et européennes

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent. On peut y accéder comme suit :

USEPA (1984) : Nebeker *et al.* (1984). Exposé des méthodes d'élevage et d'essai alors utilisées par le Laboratoire de recherche environnementale de l'USEPA à Corvallis (Oregon) pour déterminer la toxicité de sédiments contaminés d'eau douce à l'égard d'un certain nombre d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans*.

USFWS (1990) : Ingersoll et Nelson (1990). Expsé des modes opératoires d'élevage de *C. riparius* et d'*Hyalella azteca* et de l'emploi de ces organismes dans les essais de mesure de la toxicité des sédiments alors utilisés par le National Fisheries Contaminant Research Center du Fish and Wildlife Service des États-Unis, à Columbia (MO). Certains détails sont tirés d'Ingersoll *et al.* (1990).

ASTM (1991) : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials (à Philadelphie [PA]), pour la réalisation d'essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans* et *C. riparius*. Publiée de nouveau dans les années ultérieures, y compris en 1994. V. ASTM (1991a) et ASTM (1994), dans les travaux cités.

NWRI (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits), utilisés en 1992 pour l'élevage de *C. riparius* et d'autres invertébrés dulcicoles et leur emploi dans les essais toxicologiques, par K. Day, de l'Institut national de recherche sur les eaux, de la Direction de la recherche sur les cours d'eau, du Centre canadien des eaux intérieures d'Environnement Canada à Burlington (Ont.). V. NWRI (1992) dans les travaux cités.

OME (1992) : Bedard *et al.* (1992). Exposé des méthodes de laboratoire alors utilisées par la Direction des ressources hydriques du ministère de l'Environnement de l'Ontario pour l'élevage des invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans*, et leur emploi dans des essais de mesure de la toxicité des sédiments en conditions statiques. Ces méthodes ont été conçues pour permettre la comparaison directe des résultats de dosages biologiques de la toxicité d'un sédiment et des résultats de mesures de la bioaccumulation, effectués en parallèle, à l'aide d'une seule espèce à la fois, avec des larves de *C. tentans*, des nymphes d'éphéméroptères (*Hexagenia limbata*) et des têtes-de-boule.

USEPA (1992) : Synthèse de l'information trouvée dans Hoke (1992) et de l'annexe A d'USEPA (1994a), représentant les réponses de 8 laboratoires à un questionnaire envoyé par l'Office of Science and Technology de l'USEPA et l'Office of Research and Development, de Washington, sur les modes opératoires des essais de mesure de l'effet des sédiments sur la survie et la croissance de *C. tentans* ou de *C. riparius*.

RIZA (1993) : Ébauche du mode opératoire de l'élevage de *C. riparius* et de la réalisation d'essais de mesure de la toxicité des sédiments, mis au point par l'Institut de l'aménagement des eaux intérieures et du traitement des eaux usées (RIZA, Lelystad, Pays-Bas) et soumis à l'examen de l'OCDE pour servir de ligne directrice de cette organisation pour les essais sur certains produits chimiques. V. RIZA (1993) dans les travaux cités.

USEPA (1993) : Call *et al.* (1993a). Ébauche inédite d'une méthode pour l'élevage de *C. tentans* et l'emploi de cette espèce dans des essais de mesure de la toxicité des sédiments, rédigée pour et par l'USEPA.

BBA/IVA (1994) : Méthode utilisée pour un essai de comparaison d'envergure internationale utilisant des pesticides et *C. riparius*. V. BBA/IVA (1994) dans les travaux cités.

Sheffield (1994) : Modes opératoires normalisés inédits, utilisés par C. Naylor et ses collègues du département des sciences animales et végétales de l'université de Sheffield, à Sheffield (Royaume-Uni).

USEPA (1994a) : Méthodes publiées d'élevage de *C. tentans* et d'autres invertébrés dulcicoles et de mesure de la toxicité des sédiments, mises au point par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger). V. USEPA (1994a) dans les travaux cités.

1. Type et durée de l'essai ; âge et stades larvaires des organismes au début

Document[a]	Espèce	Type d'essai	Durée de l'essai (jours)	Âge au début	Stade larvaire
USEPA (1984)	*C. tentans*	CS[b]	15	10 j	2
USFWS (1990)	*C. riparius*	RC[c]	13	< 24 h	1
ASTM (1991)	*C. tentans*,	CS ou RC	10 à 14	10 à 15 j	2
	C. riparius	CS ou RC	10 à 14	≤ 24 h ou 3 j	1
NWRI (1992)	*C. riparius*	CS	10	< 48 h	1
OME (1992)	*C. tentans*	CS	10	10 à 12 j	2
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	CS ou RC[d]	10 à 14[e]	0 à 16 j[f]	2[f]
RIZA (1993)	*C. riparius*	RI[g]	28	0 h[h]	prélarvaire[h]
USEPA (1993)	*C. tentans*	RI ou RC	10	11 à 13 j	2
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	CS	environ 25	1 à 3 j	1
Sheffield (1994)	*C. riparius*	CS ou RC	10	< 96 h	2
USEPA (1994a)	*C. tentans*	RI ou RC	10	n.i.[i,j]	3[j]

a. Voir la page précédente pour obtenir la référence exacte.
b. Conditions statiques.
c. Remplacement continu.
d. Six laboratoires sur huit ont systématiquement effectué les essais en conditions statiques.
e. Dans cinq laboratoires sur huit, la durée des essais étaient de 10 j.
f. Dans sept laboratoires sur huit, les larves, du deuxième stade, étaient âgées de 10 à 14 j.
g. Renouvellement intermittent.
h. Pour entreprendre un essai, on répartit au hasard des paquets d'œufs entre les variantes.
i. Non indiqué.
j. Au moins la moitié des larves doit être au troisième stade, au début de l'essai.

2. Récipients et milieux servant aux essais

Document[a]	Espèce	Récipient	Couvercle	Quantité de sédiment	Quantité d'eau
USEPA (1984)	*C. tentans*	aquarium de 20 L ou jarre de 4 L	n.i.[a]	couche de 2 à 3 cm	couche de 15 cm
USFWS (1990)	*C. riparius*	becher de verre de 1 L	aucun[b]	200 mL	800 mL
ASTM (1991)	*C. tentans*,	divers[c]	n.i.	diverse[e]	diverse[c]
	C. riparius	divers[d]	verre de montre, si cond. statiques	diverse[d]	diverse[d]
NWRI (1992)	*C. riparius*	becher de verre de 250 mL	boîte de Petri	50 mL	200 mL
OME (1992)	*C. tentans*	jarre de verre de 1,8 L	couvercles de plastique ou de verre	325 mL	1 300 mL
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	divers[e]	n.i.	10 à 200 mL	40 à 1 800 mL
RIZA (1993)	*C. riparius*	récipient de 100 mL	n.i.	env. 10 mL	env. 40 mL
USEPA (1993)	*C. tentans*	becher de 300 mL[f]	tamis SS à mailles de 60 mesch	100 mL	env. 150 mL
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	becher de 2 à 3 L	oui	couche de 2 cm	couche de 15 à 20 cm
Sheffield (1994)	*C. riparius*	jarre de verre de 60 mL	tamis	env. 10 mL[h]	50 mL
USEPA (1994a)	*C. tentans*	becher de 300 mL[g]	n.i.	100 mL	175 mL

a. Non indiqué.

b. Au jour 0, on a utilisé un couvercle de verre, et on a aéré l'eau surnageante, alors que les conditions étaient statiques (pas de remplacement de l'eau surnageante). Au jour 1, on a fait démarrer la circulation de l'eau et on a enlevé le couvercle et interrompu l'aération.

c. On décrit un certain nombre de récipients qui conviennent aux essais. Ces récipients vont des tubes à centrifuger de plastique de 50 mL renfermant 7,5 g de sédiment et 47 mL d'eau, pour des essais avec un chironomidé à la fois, aux aquariums de 20 mL renfermant une couche de 2 à 3 cm de sédiment et, par dessus, 15 cm d'eau, pour des essais sur 100 larves.

d. Les récipients convenables comprennent les bechers de verre de 1 L, renfermant chacun 50 larves, 200 mL de sédiment et 800 mL d'eau surnageante ; les aquariums de verre de 13 L, renfermant chacun 130 larves, 2 L de sédiment et 11 L d'eau surnageante.

e. L'examen des pratiques de huit laboratoires a montré que les récipients servant aux essais allaient des tubes de plastique de 50 mL aux jarres de verre de 2 L ; le volume de sédiment, de 10 à 200 mL ; et le volume d'eau surnageante, de 40 à 1 800 mL. Dans six des huit laboratoires, le rapport du volume de sédiment à celui de l'eau était de 1/4, le rapport le plus élevé étant de 1/1.

f. Becher de forme haute, sans bec verseur, avec deux trous opposés, crépinés, (de 1,5 cm de diamètre, centré à 7,7 cm au-dessus du fond).

g. Becher de forme haute, sans bec verseur.

h. La quantité exacte ajoutée est fondée sur le poids sec.

3. Volume du récipient d'essai, nombre d'organismes par récipient et nombre de répétitions par variantes

Document	Espèce	Capacité du récipient (mL)	Nbre d'organismes par récipient	Nbre de répétitions
USEPA (1984)	*C. tentans*	20 000	100	≥ 2
USFWS (1990)	*C. riparius*	1 000	50	4
ASTM (1991)	*C. tentans*	20 000	100	n.i.[a]
ASTM (1991)	*C. tentans*	3 000	25	n.i.
ASTM (1991)	*C. tentans*	2 000	20	n.i.
ASTM (1991)	*C. tentans*	50	1	≤15
ASTM (1991)	*C. riparius*	13 000	130	n.i.
ASTM (1991)	*C. riparius*	1 000	50	n.i.
NWRI (1992)	*C. riparius*	250	15	5
OME (1992)	*C. tentans*	1 800	15	≥ 3
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	50 à 2 000[b]	1 à 80[c]	2 à 15[d]
RIZA (1993)	*C. riparius*	100	25[e]	4
USEPA (1993)	*C. tentans*	300	10	5
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	2 000 à 3 000	25	3
Sheffield (1994)	*C. riparius*	60	1	≤ 10
USEPA (1994a)	*C. tentans*	300	10	8[f]

a. Non indiqué.
b. L'examen des pratiques de huit laboratoires ont montré que les récipients y avaient les capacités suivantes : 50 mL (deux labos) ; 250 mL (deux labos) ; 300 mL (un labo) ; 1 000 mL (deux labos) ; 2 000 mL (un labo).
c. Le nombre le plus fréquent d'organismes par récipient était de 10 à 15.
d. Le nombre le plus fréquent de répétitions par variante était de trois à quatre.
e. Au premier renouvellement (c'est-à-dire après 7 j), on transfère 25 larves dans chaque récipient affecté à une répétition.
f. Selon l'objectif de l'essai. Pour les essais courants, on recommande huit répétitions.

4. Origine et dureté de l'eau, méthode de renouvellement de l'eau pendant l'essai

Document	Espèce	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Méthode de remplacement
USEPA (1984)	*C. tentans*	n.i. [a]	n.i.	CS avec compensation des pertes [b]
USFWS (1990)	*C. riparius*	reconst. [c]	134 mg/L	CS ou RC [d,e]
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	puits, surface, déchl. du robinet ou reconst.	facultative	CS ou RC
NWRI (1992)	*C. riparius*	déchl. du robinet [h]	n.i.	CS avec compensation des pertes [b]
OME (1992)	*C. tentans*	déchl. du robinet [f,g]	144 mg/L	CS avec compensation des pertes [b]
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	naturelle ou reconst. [i]	douce à très dure	CS ou renouvellement [j]
RIZA (1993)	*C. riparius*	reconst.	210 mg/L	RI, 1 fois/semaine
USEPA (1993)	*C. tentans*	eau d'élevage [k]	facultative	RI, 4 fois/jour [l]
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	puits, déchl., reconst.	facultative	CS avec compensation des pertes [b]
Sheffield (1994)	*C. riparius*	reconst. (M7)	comme l'eau d'élevage	CS ou RC
USEPA (1994a)	*C. tentans*	eau d'élevage, puits, eau locale, surface ou reconst. [m]	facultative	RI ou RC, 2 fois/jour [n]

a. Non indiqué.
b. On ajoute de l'eau distillée, au besoin, pour maintenir constant le niveau de l'eau.
c. Reconstituée. Pour l'élevage des organismes d'essai, on a utilisé de l'eau de puits d'une dureté de 283 mg/L.
d. Renouvellement continu.
e. 3,8 fois le volume du becher par jour.
f. Eau de ville du robinet, déchlorée.
g. Les sources convenables peuvent comprendre l'eau de puits non contaminée.
h. Même origine et dureté que pour l'élevage des organismes.
i. Eau de puits, cinq labos ; eau déchlorée, trois labos ; eau lacustre, un labo ; eau reconstituée, un labo.
j. Sur les huit laboratoires sondés, six effectuaient des essais en conditions statiques. La fréquence du renouvellement, le cas échéant, variait de quatre fois par jour à trois fois par semaine.
k. On peut aussi utiliser de l'eau non contaminée possédant des caractéristiques semblables à l'eau d'élevage.
l. Renouvellement intermittent. Le système automatisé est réglé de façon à assurer le remplacement d'environ quatre fois le volume du récipient par jour.
m. Une recette est fournie pour préparer une eau reconstituée convenable, d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ par litre.
n. Chaque enceinte devrait recevoir deux fois son volume d'eau surnageante par jour, de façon intermittente (manuelle ou automatisée) ou continue.

5. Température, aération et éclairage au cours de l'essai

Document	Espèce	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
USEPA (1984)	*C. tentans*	20	débit lent de l'aération de l'eau surnageante	phot. de 16 h [a]
USFWS (1990)	*C. riparius*	20 ± 2	débit lent ou nul [b]	phot. de 16 h ; 269 à 538 lux
ASTM (1991)	*C. tentans*	20 à 23 [c]	débit lent, si les conditions sont statiques	phot. de 16 h ; 538 lux
	C. riparius	20 à 22 [c]	débit lent, si les conditions sont statiques	phot. de 16 h ; 538 lux
NWRI (1992)	*C. riparius*	23 ± 1	débit lent	phot. de 16 h
OME (1992)	*C. tentans*	20 ± 2	aération [d]	phot. de 16 h ; fluorescent
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	20 à 25 [e]	débit modéré ou nul [f]	phot. de 16 h, env. 500 à 1 300 lux
RIZA (1993)	*C. riparius*	20 ± 1 [g]	aération, 3 fois/semaine [h]	phot. de 16 h
USEPA (1993)	*C. tentans*	22 à 23 ± 1	pas d'aération	phot. de 16 h ; 538 à 1 076 lux
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	20 ± 2	débit lent	phot. de 16 h ; env. 1 000 lux
Sheffield (1994)	*C. riparius*	20 ± 2	débit lent, si les conditions sont statiques	phot. de 16 h
USEPA (1994a)	*C. tentans*	23 ± 1 [c]	normalement pas d'aération [i]	phot. de 16 h, env. 500 à 1 000 lux, fluorescents en spectre large

a. Photopériode de 16 h.
b. Pour les essais en conditions statiques, on a aéré l'eau surnageante à un débit lent (environ deux bulles par seconde). En renouvellement continu de l'eau, on a assuré une aération lente au jour 0, mais on l'a interrompue au démarrage de la circulation de l'eau au jour 1.
c. La température moyenne journalière doit s'écarter de moins de 1 °C de la température souhaitée. La température instantanée doit s'écarter de moins de 3 °C de la température souhaitée.
d. Aérer l'eau surnageante en continu, à un débit assurant la saturation en oxygène. Injecter l'air par barbotage, au moyen de pipettes Pasteur dont l'extrémité plonge à 1 cm sous la surface de l'eau.
e. La température d'essai était de 20 °C (deux labos) ; de 22 °C (deux labos) ; de 23 °C (deux labos) ou de 25 °C (deux labos).
f. Sur les huit laboratoires sondés, six aéraient l'eau surnageante (essais en conditions statiques).
g. La température de l'eau ne doit différer de plus de ± 0,5 °C, d'une enceinte expérimentale à l'autre, en aucun moment au cours de l'essai.
h. Aérer l'eau surnageante dans toutes les enceintes expérimentales, trois fois par semaine, pendant environ 10 min.
i. Aérer si la teneur en OD dans l'eau surnageante chute sous 40 % du taux de saturation.

6. Alimentation au cours de l'essai

Document	Espèce	Aliments utilisés	Quantité par récipient	Fréquence des repas
USEPA (1984)	*C. tentans*	Cerophyll[MC] et flocons écrasés de Tetramin[MC]	600 mg de C, 100 mg de T	jours 0 et 8
USFWS (1990)	*C. riparius*	suspension de Cerophyll, de l'aliment pour chiens Hartz Dog Treats[MC] et de *S. capricornutum*	75 mg de C et 30 mg d'HDT[a]	journellement[a]
ASTM (1991)	*C. tentans*,	Cerophyll et/ou flocons d'aliment pour poisson	diverse[b]	1 à 7 fois par semaine[b]
	C. riparius	divers aliments[c]	diverse[c]	diverse[c]
NWRI (1992)	*C. riparius*	flocons de Nutrafin[MC] pour poisson	8 mg[d]	2 fois/semaine
OME (1992)	*C. tentans*	Cerophyll et Tetra Conditioning Food[MC]	30 mg[e]	journellement[e]
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	divers aliments[f]	diverse[f]	diverse[f]
RIZA (1993)	*C. riparius*	aliments divers (p. ex. Tetramin[MC], Trouvit[MC], ou Aquariaan[MC])	diverse[g]	diverse[g]
USEPA (1993)	*C. tentans*	Tetrafin[MC] pour poissons rouges	4 mg[h]	journellement
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	flocons de Tetramin[MC] pour poisson	env. 58 mg[i]	au moins 3 fois par semaine
Sheffield (1994)	*C. riparius*	flocons de Tetramin[MC] pour poisson	10 mg	jour 0
USEPA (1994a)	*C. tentans*	Tetrafin[MC] pour poissons rouges	6 mg[j]	journellement

a. Plus 6×10^7 cellules alguaires au jour 0. Par la suite, repas journalier (outre les algues), constitué de 15 mg de Cerophyll, des jours 1 à 6, et 30 mg de Dog Treats, les jours 1 à 12.
b. Selon le chercheur, la taille des larves et le nombre d'organismes par enceinte. Par exemple, on a donné à chaque groupe de 25 larves, dans des récipients de 3 L, 20 mg de flocons d'aliment pour poisson, chaque jour, tandis que les larves solitaires en tubes de centrifugation recevaient 0,1 mL d'une suspension de 0,06 g d'aliment pour poissons rouges par millilitre.
c. Les types d'aliments utilisés comprennent les suivants, seuls ou en combinaison : Cerophyll, flocons d'aliment pour poisson, aliment pour chien du commerce et algues. Les quantités dépendent de la taille et du nombre de larves par enceinte. La fréquence des repas est soit journalière, soit d'une fois tous les deux jours.
d. Sous forme d'une suspension de Nutrafin[MC] moulu, préparée par adjonction de 1 g de flocons à 100 mL d'eau distillée et pulvérisation. Environ 604 µL équivalent à 8 mg.
e. On mélange 0,9 mg de Cerophyll et 0,6 g de Tetra écrasé avec 100 mL d'eau pour former une suspension. On en distribue dans chaque enceinte 2 mL, journalièrement. On réduit ou on interrompt l'alimentation si on constate la présence de salissures sur les parois ou l'accumulation de nourriture.
f. Selon le laboratoire, les larves reçoivent un repas par jour ou deux ou trois repas par semaine de Tetramin, de Nutrafin, de LCT et d'algues ou de luzerne ou de Tetrafin, au choix.
g. Les larves du premier stade sont nourries une fois au jour 4 ; les autres larves sont nourries trois fois par semaine. Si on emploie une suspension à 2 %, on donne aux larves du 1er stade 50 µL, à celles du 2e stade 100 µL, à celles du 3e stade 150 µL et à celles du 4e stade 200 µL, à chaque repas.
h. Dans chaque enceinte, les larves reçoivent 1,0 mL d'une suspension de 4 mg de Tetrafin par millilitre.
i. Cela équivaut à 1 mg par larve et par jour (c'est-à-dire, en tout, 175 mg par semaine), en moins trois repas par semaine.
j. Les larves de chaque enceinte reçoivent 1,5 mL de suspension de 4 mg de Tetrafin par millilitre et par jour.

7. Surveillance de la qualité de l'eau surnageante au cours de l'essai

Document	Espèce	Variables contrôlées [a]	Fréquence
USEPA (1984)	*C. tentans*	OD, pH, alc., dur.	n.i. [b]
USFWS (1990)	*C. riparius*	OD, pH, alc., dur., cond.	au moins 10 jours, chaque variante [c]
ASTM (1991)	*C. tentans*,	OD	au début et à la fin, au moins [d, e]
	C. riparius	pH., alc., dur., cond.	au début et à la fin, au moins [d]
		temp.	journellement [d, f]
NWRI (1992)	*C. riparius*	OD, pH, cond., temp.	jours 0, 5 et 10
OME (1992)	*C. tentans*	OD, pH, cond.	jours 0, 5 et 10
		temp.	journellement
		facultatives : alc., dur., amm.	n.i.
USEPA (1992)	*C. tentans*,	n.i.	n.i.
	C. riparius		
RIZA (1993)	*C. riparius*	OD, pH, nitrites, nitrates, amm.	au début, à la fin, à chaque renouvellement de l'eau
		temp.	au moins 3 fois par semaine
		dur., cond.	au début
USEPA (1993)	*C. tentans*	OD, temp.	journellement
		pH, alc., dur., cond.	au début et à la fin [d]
		amm.	près du début et de la fin [d]
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	OD, pH, temp.	hebdomadairement
Sheffield (1994)	*C. riparius*	OD, pH, temp.	jours 0, 5 et 10
USEPA (1994a)	*C. tentans*	OD [g]	journellement
		pH [g], alc., dur., cond., amm.	début et fin [h]
		temp.	journellement [d, f]

a. **alc.** : alcalinité totale ; **amm.** : ammoniaque ; **cond.** : conductivité spécifique ; **dur.** : dureté totale ; **OD** : oxygène dissous ; **pH** : concentration de l'ion hydrogène ; **temp.** : température.

b. Non indiqué.

c. On prélève 50 mL d'eau surnageante pour les mesures. En conditions statiques, on remplace cette eau par de l'eau fraîche, dont on a réglé la température.

d. Mesure effectuée dans au moins une enceinte représentative de chaque variante.

e. Doser l'OD si l'aération (en conditions statiques) ou l'eau (renouvellement continu) sont coupés et chaque fois que le comportement des organismes (p. ex. sortis du sédiment) montre que sa concentration est trop faible.

f. La température journalière moyenne doit se situer à ± 1 °C de la température souhaitée ; la température instantanée doit se trouver à ± 3 °C de cette température.

g. On peut le doser ou le mesurer directement à l'aide d'une sonde.

h. On devrait prélever de l'eau surnageante immédiatement avant le renouvellement de l'eau, à environ 1 à 2 cm au-dessus du sédiment, à la pipette. Les valeurs ne devraient pas varier de plus de 50 % au cours de l'essai.

8. Conditions d'entreposage et caractérisation du sédiment utilisé pour l'essai

Document	Espèce	Conditions d'entreposage	Caractéristiques mesurées [a]
USEPA (1984)	*C. tentans*	à 4 °C, pendant au plus 2 semaines	facultatifs : COT, SLA, AT, M, COS
USFWS (1990)	*C. riparius*	à 4 °C, dans des sacs de Téflon dans les 24 h ; à utiliser dans les 2 semaines	COT, CI, % d'eau, SLA, M, BPC, AP
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	à 4 ± 2 °C, pendant au plus 2 semaines [b]	au moins le pH, COT, % d'eau, SLA ; on pourrait ajouter les paramètres suivants : DBO, DCO, CI, MVT, SVA, Eh, HG, OS, AT, M, AP, H_2O_p
NWRI (1992)	*C. riparius*	dans des seaux de plastique scellés, à 4 °C ; à utiliser dans les 6 semaines	COT, CI, SLA, M, $N_{t.K.}$
OME (1992)	*C. tentans*	à 4 °C, pendant au plus 4 semaines	MVT, COT, % d'eau, SLA, P, $N_{t.K.}$, M, POC ; pourrait comprendre BC, AP, CDF, PC
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	n.i. [c]	n.i.
RIZA (1993)	*C. riparius*	à 4 °C, pendant au plus 3 mois	COT, % d'eau, SLA, M, BPC, AP, P, $N_{t.K.}$, HG
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i.	n.i.
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	non exigé (sédiment artificiel)	n.i.
Sheffield (1994)	*C. riparius*	à 4 °C, pendant au plus 2 semaines [d]	COT, CI, % d'eau, SLA
USEPA (1994a)	*C. tentans*	à 4 °C, pendant au plus 2 semaines [e]	au moins le pH et AT de l'eau de porosité ainsi que : COT, % d'eau, SLA ; on pourrait y ajouter : DBO, CDO, CEC, CI, MVT, SVA, Eh, HG, COS, M, AP, H_2O_p

a. **AP** : aromatiques polycycliques ; **AT** : ammoniaque totale ; **BC** : dérivés chlorés du benzène ; **BPC** : biphényles polychlorés totaux ; **CDF** : chlorodioxine et chlorofuranne ; **CEC** : capacité d'échange cationique ; **CI** : carbone inorganique ; **COS** : composés organiques de synthèse ; **COT** : carbone organique total ; **DBO** : demande biochimique en oxygène ; **DCO** : demande chimique en oxygène ; **Eh** : potentiel d'oxydo-réduction ; **H_2O_p** : eau de porosité ; **HG** : huiles et graisses ; **M** : métaux (p. ex. As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) ; **MV** : masse volumique (g/ml) ; **MVT** : matières volatiles totales ; **$N_{t.K.}$** : azote Kjeldahl total ; **OS** : organosiliciés ; **P** : phosphore total ; **PC** : dérivés chlorés du phénol ; **pH** : concentration des ions hydrogène ; **POC** : pesticides organochlorés ; **SLA** : % de sable, de limon et d'argile ; **SVA** : sulfures volatils acides.

b. S'il est conservé plus de deux semaines, le sédiment devrait être soumis à de nouvaux essais pour confirmer la constance de sa toxicité.

c. Non indiqué.

d. La plupart des travaux courants employant un sédiment artificiel, ce dernier n'est pas entreposé avant emploi.

e. Entreprendre l'essai le plus tôt possible après le prélèvement de l'échantillon. S'il débute après deux semaines après le prélèvement, des caractérisations supplémentaires du sédiment sont souhaitables pour évaluer les effets possibles de l'entreposage.

9. Manipulation du sédiment avant l'essai

Document	Espèce	Manipulation du sédiment
USEPA (1984)	*C. tentans*	Mélanger à fond ; passer au travers d'au moins un tamis normalisé, afin d'en éliminer les grosses particules et les organismes endémiques.
USFWS (1990)	*C. riparius*	Mélanger dans le récipient d'entreposage ; lisser une partie aliquote à la cuillère de Téflon[MC], dans le becher d'essai ; verser graduellement l'eau surnageante, le long de la paroi du becher ; laisser reposer pendant la nuit avant l'admission des larves de chironomidés.
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	Mélanger à fond ; on peut effectuer un tamisage sous pression, pour éliminer les grosses particules et les organismes indigènes ; on peut diluer le sédiment et le mélanger avec son volume d'eau surnageante pour faciliter le tamisage ; lisser la surface dans l'enceinte expérimentale ; verser au-dessus l'eau surnageante, doucement, le long de la paroi du becher ; laisser reposer durant la nuit avant d'y porter les larves de chironomidés.
NWRI (1992)	*C. riparius*	Passer au tamis à mailles de 250 µm, en utilisant une partie de l'eau surnageante pour l'essai ; rejeter le refus du tamis et laisser le sédiment tamisé et l'eau surnageante reposer au cours de la nuit ; décanter l'eau surnageante pour l'utiliser dans l'essai ; déposer le sédiment dans des bechers des répétitions, puis l'eau surnageante ; laisser reposer au cours de la nuit ; aérer au moins une heure avant d'admettre les larves de chironomidés. [a]
OME (1992)	*C. tentans*	Décanter l'eau excédentaire du sédiment ; exprimer le sédiment au tamis à mailles de 2 mm, afin de le débarrasser des gros débris et organismes ; homogénéiser le sédiment tamisé avec une cuiller d'acier inoxydable ; égaliser en une couche uniforme (2 cm) dans le becher, en tapotant la paroi de ce dernier ; ajouter doucement l'eau surnageante ; laisser reposer pendant la nuit ; aérer au moins une heure avant d'admettre les larves de chironomidés.
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	n.i. [b]
RIZA (1993)	*C. riparius*	Passer au tamis à mailles de 500 µm ; irradier, au besoin ; homogénéiser à fond, mélanger avec de l'eau de dilution dans un rapport 1/4 ; enrichir avec la substance toxique ; soumettre à un brassage mécanique d'au moins 20 h ; laisser reposer de un à trois jours avant d'y porter les organismes d'essai.
USEPA (1993)	*C. tentans*	Passer au tamis grossier (p. ex. à mailles de 5 mm) ; homogénéiser à fond ; verser dans le becher ; laisser reposer 24 h avant d'ajouter les organismes d'essai.
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	Mélanger le sédiment artificiel, l'ajouter au becher, recouvrir soigneusement d'eau témoin ou de dilution et laisser reposer au moins une semaine avant d'y ajouter les organismes.
Sheffield (1994)	*C. riparius*	Mélanger, y compris toute eau séparée ; les échantillons ne devraient pas être tamisés ; éliminer les gros organismes et les gros débris à l'aide de pincettes ; laisser reposer 24 h avant d'ajouter les organismes d'essai.
USEPA (1994a)	*C. tentans*	Mélanger, y compris toute eau séparée ; les échantillons ne devraient pas être tamisés [c] ; éliminer les gros organismes et les gros débris à l'aide de pincettes.

a. Dans certaines situations, on congèle le sédiment tamisé 24 h et on le fait dégeler, afin de tuer tous les œufs de tubifex.
b. Non indiqué.
c. S'il faut tamiser le sédiment, on devrait prélever les échantillons avant et après le tamisage (p. ex. pour l'analyse des métaux de l'eau de porosité) afin de déterminer l'influence du tamisage sur les caractéristiques chimiques du sédiment.

10. Fin de l'essai et paramètres de mesure biologiques

Document	Espèce	Fin de l'essai	Paramètres de mesure biologiques
USEPA (1984)	*C. tentans*	Tamiser le sédiment pour récupérer les larves ; tuer ces dernières à l'eau tiède ; éponger jusqu'à siccité, peser ou mesurer.	pourcentage de survie, poids humide moyen, longueur moyenne du corps
USFWS (1990)	*C. riparius*	Tamisage hydraulique du sédiment en cinq étapes ; préserver les organismes dans une solution de sucre et de formol, en vue de mesures ultérieures[a]	pourcentage de survie, largeur de la capsule céphalique
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	Passer le sédiment au tamis à mailles de 500 µm, rincer ; compter ; mesurer la croissance[b]	pourcentage moyen de survie, poids sec moyen[b]
NWRI (1992)	*C. riparius*	Passer le contenu du becher au tamis à mailles de 500 µm ; compter et peser les organismes survivants.	pourcentage moyen de survie, poids sec moyen[c]
OME (1992)	*C. tentans*	Tamiser le contenu de l'enceinte expérimentale ; rincer ; compter et éponger les organismes survivants jusqu'à siccité ; peser chaque larve à 0,01 mg près[d]	pourcentage moyen de survie, poids humide[d]
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	n.i.[e]	survie, poids[f]
RIZA (1993)	*C. riparius*	Passer le sédiment de l'enceinte expérimentale au tamis à mailles de 250 µm ; compter et assécher les survivants ; peser.	survie, poids sec des larves du 4e stade
USEPA (1993)	*C. tentans*	Passer le sédiment de l'enceinte expérimentale au tamis à mailles de 0,59 µm ; compter ; sécher à l'étuve pendant au moins 2 h à 100 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant ; peser collectivement les survivants.	pourcentage moyen de survie, poids sec moyen
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	10 jours après la sortie du dernier adulte ou après la sortie de 90 % des organismes témoins.	pourcentage d'émergence des adultes, temps mis jusqu'à l'émergence
Sheffield (1994)	*C. riparius*	Transvaser le sédiment dans une boîte de Petri ; en extraire les larves à l'aide de pincettes.	survie, longueur, poids humide et sec
USEPA (1994a)	*C. tentans*	Passer le sédiment au tamis à mailles de 710 µm ou au travers de tamis multiples ; compter les survivants ; mesurer collectivement leurs poids secs[g]	pourcentage moyen de survie, poids sec moyen[g]

a. On présume que les organismes non retrouvés sont morts et qu'ils se sont désintégrés.
b. Le poids sec (séchage à 60 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant) est préférable à la longueur. On peut également estimer la croissance par la mesure de la largeur de la capsule céphalique.
c. On fait sécher à 60 °C, pendant 24 h, les animaux survivants de chaque becher, puis on les pèse collectivement.
d. On peut également obtenir le poids sec par séchage jusqu'à l'obtention d'un poids constant. On peut aussi utiliser la longueur comme indicateur de la croissance.
e. Non indiqué.
f. 7 des 8 laboratoires sondés utilisaient le poids sec à la fin de l'essai comme indice de la croissance ; 1, la longueur.
g. Réunir les survivants et sécher à 60-90 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Porter à la température ambiante dans un dessiccateur, puis peser à 0,01 mg près. La mesure de la longueur est facultative.

11. Utilisation de sédiments témoins ou de référence et exigences relatives à la validité de l'essai

Document	Espèce	Sédiment témoin ou de référence	Condition de validité de l'essai
USEPA (1984)	*C. tentans*	prélever et utiliser un sédiment témoin non contaminé[a]	n.i.[b]
USFWS (1990)	*C. riparius*	sédiment témoin fin	n.i.
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	chaque essai exige un sédiment témoin négatif (non contaminé) ou un sédiment de référence non contaminé[c]	taux moyen de survie chez les organismes témoins d'au moins 70 %[d]
NWRI (1992)	*C. riparius*	sédiment témoin et de référence non contaminé	taux moyen de survie chez les organismes témoins d'au moins 80 %
OME (1992)	*C. tentans*	sédiment témoin et de référence non contaminé	taux moyen de survie chez les organismes témoins d'au moins 75 %
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	sédiment témoin non contaminé	taux de survie chez les organismes témoins de 70 à 80 %[e]
RIZA (1993)	*C. riparius*	sédiment de référence non contaminé	taux moyen de survie chez les organismes témoins d'au moins 90 %, poids sec moyen d'au moins 0,3 mg[f]
USEPA (1993)	*C. tentans*	sédiment témoin et de référence négatif	taux moyen de survie chez les organismes témoins d'au moins 70 %[g]
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	sédiment artificiel	taux moyen d'émergence des adultes témoins d'au moins 70 %
Sheffield (1994)	*C. riparius*	sédiment de référence non contaminé ou sédiment artificiel	taux moyen de survie chez les témoins d'au moins 80 %
USEPA (1994a)	*C. tentans*	sédiment témoin et de référence négatif	taux moyen de survie chez les témoins d'au moins 70 %, poids sec moyen d'au moins 0,6 mg[h]

a. La granulométrie et la teneur en matières organiques devraient être semblables à celles de l'échantillon ou des échantillons de sédiment contaminé.
b. Non indiqué.
c. Le sédiment de référence devrait être prélevé sur le terrain, dans un secteur non pollué et il représente le sédiment d'essai par ses caractéristiques (p. ex. granulométrie, carbone organique total, pH).
d. L'essai est inacceptable si le taux moyen de survie des organismes dans une enceinte expérimentale renfermant le sédiment témoin négatif est inférieur à 70 %.
e. Sur les 8 laboratoires sondés, 4 exigeaient un taux de survie chez les témoins d'au moins 70 %, les autres d'au moins 75 à 80 %.
f. Taille moyenne de *C. riparius* du 4[e] stade, dans le sédiment témoin, devant être d'au moins 0,3 mg à la fin de l'essai.
g. D'après le taux moyen de survie de toutes les répétitions des témoins réunis.
h. La taille moyenne de *C. tentans* dans le sédiment témoin doit être d'au moins 0,6 mg à la fin de l'essai.

Annexe E

Variantes du mode opératoire des essais toxicologiques de référence à l'aide de chironomes, décrites dans les méthodes canadiennes, américaines et européennes

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent. On peut y accéder comme suit :

USEPA (1984) : Nebeker *et al.* (1984). Exposé des méthodes d'élevage et d'essai alors utilisées par le Laboratoire de recherche environnementale de l'USEPA à Corvallis (Oregon) pour déterminer la toxicité de sédiments contaminés d'eau douce à l'égard d'un certain nombre d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans*.

USFWS (1990) : Ingersoll et Nelson (1990). Expsé des modes opératoires d'élevage de *C. riparius* et d'*Hyalella azteca* et de l'emploi de ces organismes dans les essais de mesure de la toxicité des sédiments alors utilisés par le National Fisheries Contaminant Research Center du Fish and Wildlife Service des États-Unis, à Columbia (MO).

ASTM (1991) : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials (à Philadelphie [PA]), pour la réalisation d'essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans* et *C. riparius*. Publiée de nouveau dans les années ultérieures, y compris en 1994. V. ASTM (1991a) et ASTM (1994), dans les travaux cités.

NWRI (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits), utilisés en 1992 pour l'élevage de *C. riparius* et d'autres invertébrés dulcicoles et leur emploi dans les essais toxicologiques, par K. Day, de l'Institut national de recherche sur les eaux, de la Direction de la recherche sur les cours d'eau, du Centre canadien des eaux intérieures d'Environnement Canada à Burlington (Ont.). V. NWRI (1992) dans les travaux cités.

OME (1992) : Bedard *et al.* (1992). Exposé des méthodes de laboratoire alors utilisées par la Direction des ressources hydriques du ministère de l'Environnement de l'Ontario pour l'élevage des invertébrés dulcicoles, y compris *C. tentans*, et leur emploi dans des essais de mesure de la toxicité des sédiments en conditions statiques. Ces méthodes ont été conçues pour permettre la comparaison directe des résultats de dosages biologiques de la toxicité d'un sédiment et des résultats de mesures de la bioaccumulation, effectués en parallèle, à l'aide d'une seule espèce à la fois, avec des larves de *C. tentans*, des nymphes d'éphéméroptères (*Hexagenia limbata*) et des têtes-de-boule.

USEPA (1992) : Synthèse de l'information trouvée dans Hoke (1992) et de l'annexe A d'USEPA (1994a), représentant les réponses de 8 laboratoires à un questionnaire envoyé par l'Office of Science and Technology de l'USEPA et l'Office of Research and Development, de Washington, sur les modes opératoires des essais de mesure de l'effet des sédiments sur la survie et la croissance de *C. tentans* ou de *C. riparius*.

RIZA (1993) : Ébauche du mode opératoire de l'élevage de *C. riparius* et de la réalisation d'essais de mesure de la toxicité des sédiments, mis au point par l'Institut de l'aménagement des eaux intérieures et du traitement des eaux usées (RIZA, Lelystad, Pays-Bas) et soumis à l'examen de l'OCDE pour servir de ligne directrice de cette organisation pour les essais sur certains produits chimiques. V. RIZA (1993) dans les travaux cités.

USEPA (1993) : Call *et al.* (1993a). Ébauche inédite d'une méthode pour l'élevage de *C. tentans* et l'emploi de cette espèce dans des essais de mesure de la toxicité des sédiments, rédigée pour et par l'USEPA.

BBA/IVA (1994) : Méthode utilisée pour un essai de comparaison d'envergure internationale utilisant des pesticides et *C. riparius*. V. BBA/IVA (1994) dans les travaux cités.

Sheffield (1994) : Modes opératoires normalisés inédits, utilisés par C. Naylor et ses collègues du département des sciences animales et végétales de l'université de Sheffield, à Sheffield (Royaume-Uni).

USEPA (1994a) : Méthodes publiées d'élevage de *C. tentans* et d'autres invertébrés dulcicoles et de mesure de la toxicité des sédiments, mises au point par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger). V. USEPA (1994a) dans les travaux cités.

1. Toxique(s) de référence, type et durée de l'essai, fréquence d'emploi

Document[a]	Espèce	Toxique(s) de référence	Type d'essai	Durée de l'essai	Fréquence d'emploi
USEPA (1984)	*C. tentans*	aucun	aucun	—	—
USFWS (1990)	*C. riparius*	aucun	aucun	—	—
ASTM (1991)	*C. tentans*, *C. riparius*	aucun	aucun	—	—
NWRI (1992)	*C. riparius*	$CuSO_4$	conditions statiques, eau seulement[b]	48 h	mensuellement[c]
OME (1992)	*C. tentans*	Cd, Cu[d]	eau seulement[d]	n.i.[e]	n.i.
USEPA (1992)	*C. tentans*, *C. riparius*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
RIZA (1993)	*C. riparius*	$K_2Cr_2O_7$, 3,4-dichloroaniline	eau seulement	96 h	au moins 2 fois par année
USEPA (1993)	*C. tentans*	$CuSO_4$, KCl	conditions statiques, eau seulement	96 h	mensuellement
BBA/IVA (1994)	*C. riparius*	aucun	aucun	—	—
Sheffield (1994)	*C. riparius*	aucun	aucun	—	—
USEPA (1994a)	*C. tentans*	NaCl, KCl, Cd, Cu[f]	conditions statiques, eau seulement	96 h	mensuellement[g]

a. Voir la page précédente pour obtenir la référence exacte.
b. Les larves de chironomidés sont exposées à une gamme de concentrations du toxique de référence dissous dans de l'eau douce ; l'essai se déroule en l'absence complète de sédiment.
c. Les essais toxicologiques de référence (toxicité chronique) avec un sédiment ont lieu deux fois par année. On utilise $CuSO_4$ et $CdCl_2$.
d. On recommande un essai avec témoin positif, pour le dosage de l'eau seulement à l'aide de cadmium et/ou de cuivre. On ne donne aucune précision sur le mode opératoire des essais toxicologiques de référence effectués avec *C. tentans*.
e. Non indiqué.
f. Conviennent : le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le chlorure de cadmium, le sulfate de cuivre. Il pourrait être irréaliste d'éprouver plus d'un ou de deux toxiques de référence de façon systématique (c'est-à-dire mensuellement).
g. Idéalement, les essais utilisant des toxiques de référence devraient être effectuées de concert avec des essais de mesure de la toxicité du sédiment.

2. Nombre d'organismes par récipient, âge et stade larvaire au début de l'essai, type et contenance des récipients, volume de solution d'essai et nombre de répétitions par variante de l'expérience

Document	Espèce	Nbre par récipient	Âge au début	Stade larvaire au début	Enceinte expérimentale	Volume de solution	Nbre de répétitions
NWRI (1992)	*C. riparius*	15	6 jours	2	becher, 250 mL [a]	200 mL	3 à 5
RIZA (1993)	*C. riparius*	n.i. [b]	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i.	n.i.	2	becher, 250 mL	150 mL	n.i.
USEPA (1994a)	*C. tentans*	≥ 10 [c]	n.i.	3	becher, 250 mL [d]	≥100 mL	≥ 3
		1 [c]	n.i.	3	gobelet de 30 mL [e]	20 mL	≥ 10

a. Becher de verre.
b. Non indiqué.
c. On peut effectuer les essais toxicologiques de référence en employant un organisme par récipient ou au moins 10 organismes par récipient. Certains laboratoires ont observé un faible taux de survie des organismes témoins lorsque l'on utilise plus d'un chironomidé par récipient dans les essais dans l'eau seulement.
d. Becher de verre recouvert de verre ou de plastique.
e. Gobelet de plastique, couvert de verre ou de plastique.

3. Origine et dureté de l'eau utilisée dans les essais, et variables contrôlées

Document	Espèce	Nbre par récipient	Origine de l'eau	Variables contrôlées [a]	Fréquence des contrôles
NWRI (1992)	*C. riparius*	15	déchl. rob. [b]	OD, pH, cond.	début et fin
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i. [c]	n.i.	n.i.	n.i.
RIZA (1994)	*C. riparius*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	*C. tentans*	≥ 10 ou 1 [d]	élevage, puits, eau locale, surface, reconst. [e]	pH, alc., dur., cond., temp., OD	début et fin journellement

a. **alc.** : alcalinité totale ; **cond.** : conductivité spécifique ; **dur.** : dureté totale ; **OD** : oxygène dissous ; **pH** : concentration des ions hydrogènes ; **temp.** : température.
b. Eau déchlorée de robinet et de la ville ; de même origine et dureté que l'eau d'élevage des chironomidés.
c. Non indiqué.
d. Les essais toxicologiques de référence peuvent utiliser un organisme par récipient ou au plus 10 organismes par récipient.
e. Eau reconstituée. Une recette est fournie pour préparer une eau convenable, d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ par litre.

4. Température, aération et éclairage au cours de l'essai employant un toxique de référence

Document	Espèce	Nbre par récipient	Temp. de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
NWRI (1992)	*C. riparius*	15	n.i.	n.i.	n.i.
RIZA (1993)	*C. riparius*	n.i. [a]	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i.	temp. ambiante	n.i.	temp. ambiante
USEPA (1994a)	*C. tentans*	≥ 10 ou 1 [b]	23	aucune	phot. de 16 h, à ~ 500 à 1 000 lux, fluorescents en spectre large

a. Non indiqué.
b. Les essais toxicologiques de référence peuvent employer un organisme ou au moins 10 organismes par récipient.

5. Substrat utilisé dans l'essai avec toxique de référence

Document	Espèce	Nbre par récipient	Description du substrat	Quantité de substrat
NWRI (1992)	*C. riparius*	15	n.i. [a]	n.i.
RIZA (1993)	*C. riparius*	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i.	sable de silice de qualité n° 30	couche légère
USEPA (1994a)	*C. tentans*	≥ 10 ou 1 [b]	sable	une seule couche

a. Non indiqué.
b. Les essais toxicologiques de référence peuvent utiliser un organisme ou au moins 10 organismes par récipient.

6. Alimentation durant l'essai à l'aide d'un toxique de référence

Document	Espèce	Nbre par récipient	Aliment utilisé	Quantité par récipient	Fréquence des repas
NWRI (1992)	*C. riparius*	15	n.i. [a]	n.i.	n.i.
RIZA (1993)	*C. riparius*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i.	nourriture pour poissons rouges Tetrafin[MC]	4 mg [b]	au jour 0 seulement
USEPA (1994a)	*C. tentans*	≥ 10	Tetrafin[MC]	5 mg [c]	aux jours 0 et 2
		1	Tetrafin[MC]	1 mg [d]	aux jours 0 et 2

a. Non indiqué.
b. Les organismes de chaque enceinte expérimentale reçoivent 1,0 mL d'une suspension de 4 mg de Tetrafin[MC] par millilitre.
c. Les organismes de chaque enceinte expérimentale reçoivent 1,25 mL d'une suspension de 4 mg de Tetrafin[MC] par millilitre.
d. La larve solitaire de chironomidés dans chaque gobelet reçoit 0,25 mL d'une suspension de 4 mg de Tetrafin[MC] par millilitre.

7. Paramètres de mesure et conditions de validité des essais avec toxique de référence

Document	Espèce	Nbre par récipient	Paramètre de mesure biologique	Paramètre de mesure statistique	Condition de validité
NWRI (1992)	*C. riparius*	15	taux de survie	CL50 après 48 h [a]	taux moyen de survie ≥ 90 % [b]
RIZA (1993)	*C. riparius*	n.i. [c]	taux de survie	CL50 après 96 h	limites précisées de confiance à 95 % [d]
USEPA (1993)	*C. tentans*	n.i.	taux de survie	CL50 après 96 h	n.i.
USEPA (1994a)	*C. tentans*	≥ 10	taux de survie	CL50 après 96 h	taux moyen de survie ≥ 80 % [b]
		1	taux de survie	CL50 après 96 h	taux moyen de survie ≥ 80 % [b]

a. Concentration létale médiane.
b. Pour les témoins utilisés dans l'essai avec toxique de référence.
c. Non indiqué.
d. Limites de confiance à 95 % > 20 mg/L, < 75 mg/L dans le cas de $K_2Cr_2O_7$; > 4 mg/L, < 12,5 mg/L, dans le cas de la 3,4-dichloroaniline.

Annexe F

Systématique générale de *Chironomus tentans* (Fabricius, 1805)[53]

Taxonomie et rapports phylogénétiques

Chironomus tentans est un gros chironomidé non piqueur (ordre Diptera ou mouches véritables), qui possède deux stades larvaires aquatiques et un bref stade adulte terrestre. L'espèce appartient à la famille Chironomidae (= Tendipedidae), sous-famille Chironominae, tribu Chironomini et sous-genre *Camptochironomus*. Pour le non-spécialiste, les chironomidés, plus particulièrement leurs larves, sont difficiles à identifier, faute de descriptions taxonomiques ; en outre, la plupart des espèces ne sont décrites qu'au stade adulte ou imago (Pinder, 1983).

Dans les figures F.1 et F.2, nous montrons la morphologie générale des larves, des nymphes et des adultes du genre *Chironomus* spp. La figure F.3 montre les caractéristiques de *C. tentans* aux stades larvaire et adulte.

Répartition

Holarctique, *C. tentans* est répandu en Europe, de l'Autriche, au sud, jusqu'en Angleterre, à l'ouest, à la Scandinavie, au nord, et à la Russie, à l'est (Acton et Scudder, 1971). En Amérique du Nord, on l'a observé au Canada (Colombie-Britannique, Alberta, Saskatchewan, Manitoba, Ontario et Québec) ainsi qu'aux États-Unis (Massachusetts, New York, Michigan, Illinois, Wisconsin, Minnesota, Iowa, Idaho, Dakota du Nord, Dakota du Sud, Colorado, Montana et Utah) [Townes, 1945].

Écologie

La famille Chironomidae est le groupe d'insectes le plus ubiquiste et habituellement le plus abondant parmi tous les types dulcicoles, sa densité atteignant souvent plusieurs milliers d'individus par mètre carré (Pinder, 1983). En Amérique du Nord et en Europe, on trouve les larves de *C. tentans* dans les eaux peu profondes, stagnantes ou lentes formant des nappes semi-permanentes occupées par une végétation aquatique et où abonde la matière organique en décomposition, par exemple feuilles et algues mortes (Acton et Scudder, 1971 ; Curry, 1962 ; Topping, 1971 ; Townes, 1945). L'espèce a également été observée dans les eaux saumâtres peu profondes du nord de l'Europe (Acton et Scudder, 1971) et elle serait indicatrice souvent de l'existence d'une pollution organique modérée (Townes, 1945). En Colombie-Britannique, on a observé ses larves dans les lacs à des profondeurs allant jusqu'à 2 m (Topping, 1971). On les trouve le plus souvent dans les boues molles du fond (granulométrie de moins de 0,15 mm et teneur en carbone organique de 1,9 à 5,4 %) ainsi que dans les détritus. On a observé les larves à

53. Texte préparé par P. Hamr, Direction de la recherche sur les cours d'eau de l'Institut national de recherche sur les eaux, Environnement Canada, Centre canadien des eaux intérieures, Burlington (Ont.).

des températures de 0 à 23 °C, à des teneurs en oxygène dissous de 0,2 à 8,2 mg/L, au pH de 8,0 à 9,2 et à une conductivité de 481 à 4 136 µSi/cm. Le sulfure d'hydrogène semble limiter la présence de l'espèce dans l'eau, les larves étant absentes lorsque les concentrations excèdent 0,3 mg/L (Topping, 1971).

Les larves habitent la couche supérieure (10 cm) des sédiments et elles construisent des tubes ou des cases dans lesquelles elles se fixent par leurs extrémités caudales. Elles aspirent les particules d'aliment dans les tubes, mais elles se nourrissent également à proximité immédiate des tubes (ASTM, 1991a, 1995a). Les larves de *C. tentans* consomment une grande variété de particules d'aliments, y compris des *Zygema*, des *Cladophora*, des *Spirogyra*, des diatomés, des desmidales et des *Lemna* broyés (Sadler, 1935). Elles peuvent également ingérer du limon en même temps que les particules alimentaires (Sadler, 1935). Elles sont un élément important du régime des macro-invertébrés, des poissons et des oiseaux aquatiques (Townsend *et al.*, 1981).

C. tentans cohabite avec d'autres chironomidés, notamment *C. riparius* de même qu'avec *Glyptotendipes* spp., *Anatopynia* spp. et *Limnochironomus* spp. L'absence de larves de *C. tentans* dans les lacs de la Colombie-Britannique à des profondeurs supérieures à 2 m serait le signe d'une concurrence interspécifique (Topping, 1971).

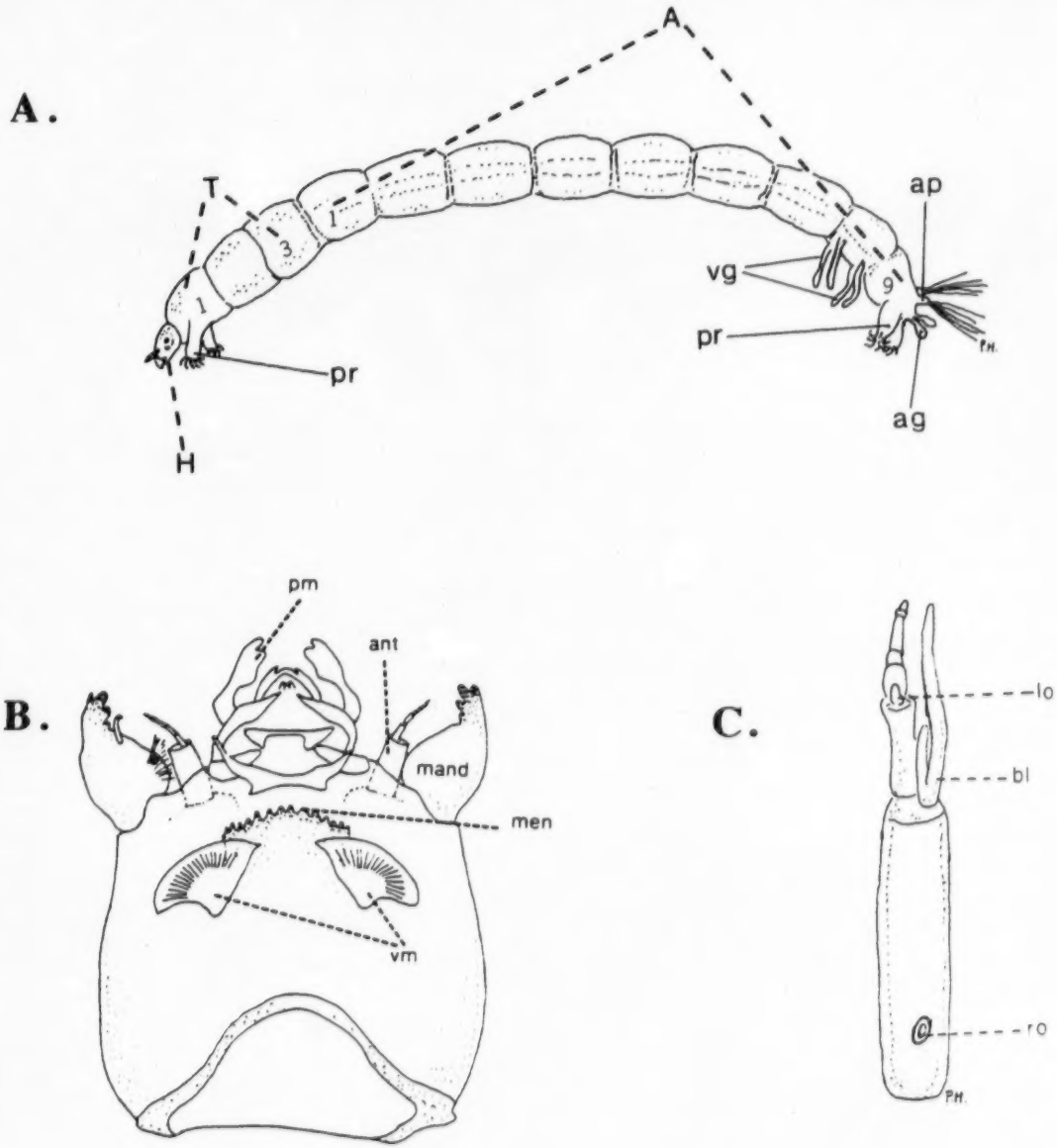
Cycle biologique et reproduction

Le cycle biologique de *C. tentans* compte les quatre stades distincts suivants : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (imago). La larve et la nymphe sont aquatiques. Les adultes peuvent être capturés du printemps à l'automne (d'avril à septembre) [Townes, 1945]. Les mâles adultes se distinguent des femelles par leurs grandes antennes plumeuses, un abdomen beaucoup plus mince, des pièces génitales visibles consistant en une paire de pinces à l'extrémité postérieure de l'abdomen (fig. F.3f). Les femelles adultes sont environ deux fois plus lourdes que les mâles, et environ 30 % de leur poids est dû aux œufs (ASTM 1991a, 1995a). L'accouplement, qui se fait à l'initiative du mâle, se produit en vol et dure environ 20 secondes (Townsend *et al.*, 1981). Les mâles sont capables de s'accoupler avec plus d'une femelle. Les spermatozoïdes sont conservés dans la paire de spermathèques de la femelle jusqu'à la ponte. 24 à 48 h après l'accouplement, la femelle pond une seule masse d'œufs translucides et gélatineux, directement dans l'eau. La gélatine est hygroscopique, et la masse d'œufs rapidement, en gonflant rapidement, affecte la forme caractéristique d'un C. La masse d'œufs en renferme environ 2 300 et elle éclora en deux à quatre jours à 23 °C (ASTM, 1995a).

La forme larvaire compte quatre stades. Au premier stade, la larve mesure de 0,6 à 1,2 mm de longueur, elle est blanc crème, elle reste sur la masse gélatineuse ou à l'intérieur, initialement. La largeur de la capsule céphalique des premiers stades est normalement dans la fourchette de 0,09 à 0,13 mm. Les premiers stades entreprennent la construction du tube dans le sédiment de surface deux ou trois jours après l'éclosion. Le deuxième stade larvaire est rose, en raison de la production d'hémoglobine, elle mesure de 2,0 à 4,5 mm de longueur, tandis que la largeur de la capsule céphalique est de 0,18 à 0,23 mm. Les troisième et quatrième stades larvaires sont rouge vif. Le troisième stade mesure 6 à 12 mm de longueur et la largeur de la capsule céphalique est de

0,33 à 0,45 mm. Le quatrième stade mesure de 12 à 24 mm de longueur et possède une capsule céphalique d'une largeur de 0,63 à 0,71 mm. Il se distingue par la bande longitudinale noire qui traverse le front et le clypéus, sur la capsule céphalique (Townsend *et al.*, 1981 ; Norberg-King,1994).

La métamorphose a lieu dans le tube construit par la larve. La nymphe quitte le tube après la nymphose et nage à la surface du sédiment. Elle est noire, et sa métamorphose la plus évidente est l'apparition d'organes et d'appendices respiratoires et locomoteurs (Townsend *et al.*, 1981). Ce stade dure environ trois jours, après quoi la nymphe gagne la surface de l'eau où a lieu l'émergence. Ce processus dure une quinzaine de secondes. En tout, la larve devient nymphe et émerge sous forme adulte après environ 21 jours, à 23 °C. La forme adulte dure de trois à cinq jours, au cours desquels les adultes se reproduisent.

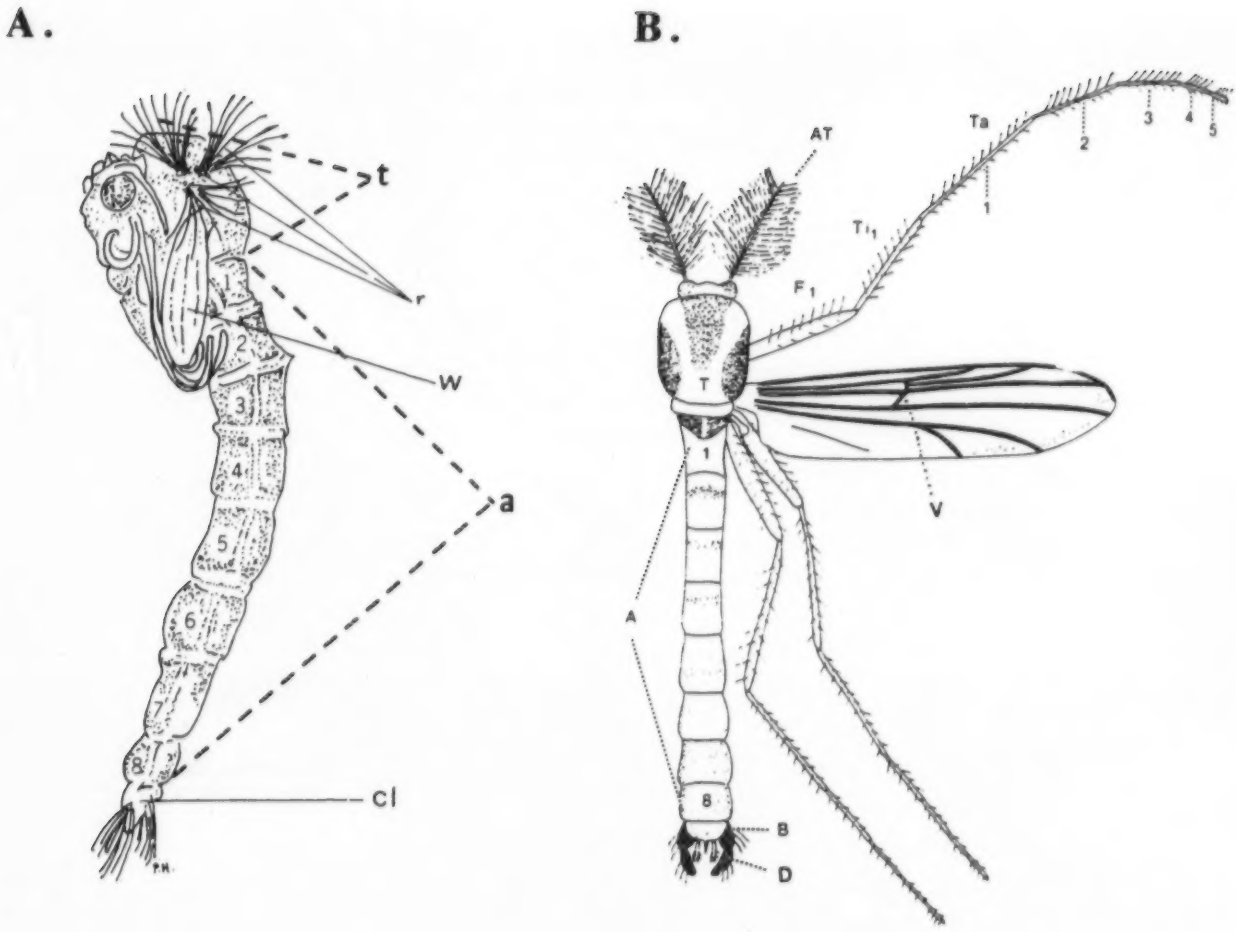


A. Vue latérale d'une larve de chironomidé.
H, capsule céphalique ; *T1-3*, segments thoraciques ; *A1-9*, segments abdominaux ; *ap*, papilles anales (procerques) ; *pr*, parapodes ; *vg*, branchies ventrales (tubules) ; *ag*, branchies anales (tubules).

B. Vue ventrale de la capsule céphalique d'un Chironomini.
ant, antenne ; *mand*, mandibule ; *men*, mentum (plaque labiale) ; *vm*, plaque ventromentale (paralabiale) ; *pm*, prémandibule.

C. Antenne. *ro*, organe en anneau ; *bl*, lame ; *lo*, organe de Lauterborn.

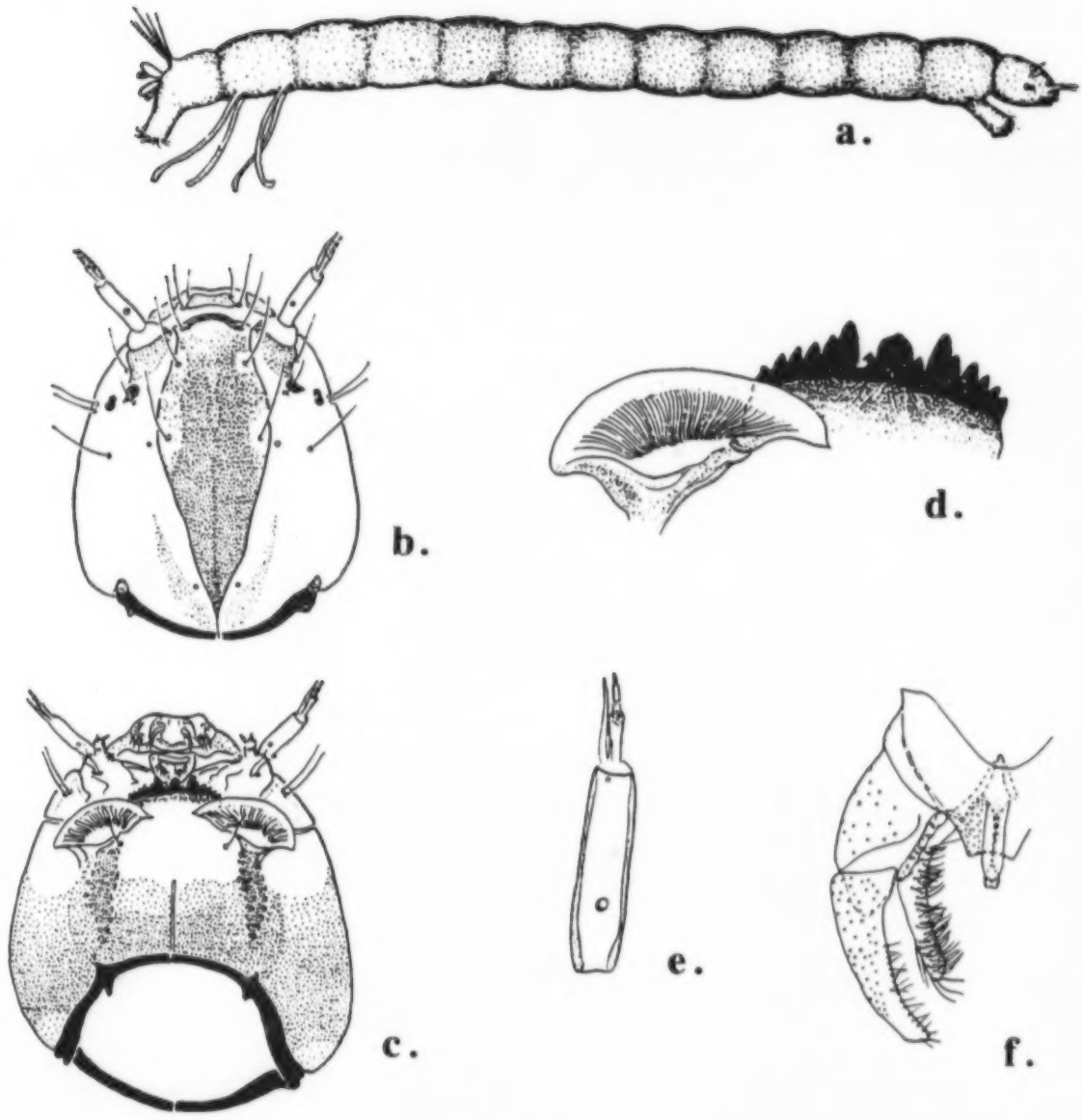
Figure F.1 Morphologie générale des larves de *Chironomus* spp. (d'après Coffman, 1984 et Cranston et Reiss, 1983)



A. Vue latérale de la nymphe d'un chironome (*Chironomus* sp.)
t, thorax ; *a*, abdomen ; *r*, organes de la respiration ; *w*, fourreau alaire ; *cl*, lobe caudal.

B. Vue dorsale d'un mâle adulte de chironomidé (Chironomini).
AT, antenne ; *T*, thorax ; *A*, tergites abdominaux 1-8 ; *B*, gonocoxite (basistyle génital) ; *D*, gonostyle (dististyle génital ; F_1, fémur de la patte antérieure ; Ti_1, tibia de la patte antérieure ; *Ta1-5*, segments tarsaux de la patte antérieure ; *V*, nervule transverse radio-médiane.

Figure F.2 **Morphologie générale de la nymphe et de l'imago de *Chironomus* spp.**
(d'après Coffman, 1984)



LARVE *a*) larve, vue latérale ; *b*) capsule céphalique, vue dorsale ; *c*) capsule céphalique, vue ventrale ; *d*) menton et plaque ventromentale ; *e*) antenne.

ADULTE *f*) genitalia du mâle.

Figure F.3 ***Chironomus tentans*** (Fabricius, 1805) [d'après Malloch, 1917 ; Townes, 1945 ; Kiknadze *et al.*, 1991)

Chironomus tentans (Fabricius, 1805)

Figure F.1. — Diagnose (d'après Johannsen, 1937a et b ; Townes, 1945 ; Curry, 1962 ; Coffman, 1984)

Larve : De 18 à 27 mm de longueur, comprenant trois parties : tête sclérotisée, thorax (3 segments) et abdomen (9 segments). Abdomen possédant quatre longues branchies ventrales et deux paires de branchies anales (fig. F.2a). Papilles anales (procerques) possédant un pénicille de 6 poils. Labre possédant soies, épines et écailles pectinées. Plaque épipharyngienne armée de 13 à 15 dents. Antenne d'environ 0,25 mm de longueur, avec organe en anneau sur le tiers basal du premier segment. Lame antennaire se prolongeant de la base du deuxième segment jusqu'à la base du cinquième (fig. F.2e), et organes de Lauterborn situées à la base du troisième segment. Mandibules possédant un peigne préapical constitué d'une dizaine de soies, de quatre dents noires, d'une dent accessoire pâle, robuste mais courte, et deux ou trois sillons sur la marge basale intérieure de couleur pâle. Maxilles deux fois plus larges que longues et palpe deux fois plus long que large, doté des papilles sensorielles habituelles. Plaque labiale armée de 13 dents noires, les deuxièmes dents latérales étant plus grandes que la dent médiane trilobée (fig. F.2d). Plaque épipharyngienne à 13 dents lobées, dont la taille varie de grande à petite. Court processus, à l'aspect de branchie, présent sur la marge latéropostérieure du dixième segment.

Nymphe : De 10 à 12 mm de longueur, rouge immédiatement après la nymphose, mais prenant ensuite une teinte plus foncée. Sternites 2 à 4 armées de spinules minuscules disposées en rangées, par groupe de 2 à 5 ou plus sur la partie latéro-antérieure. Les segments 7 et 8 ayant respectivement 3 et 4 filaments. Éperon sur le segment 8 composé de 5 à 9 épines fusionnées ; frange du lobe caudal ayant environ 125 filaments. Évagination tubulaire, à l'aspect de branchies, de chaque côté de la conjonctive. Tubercules céphaliques coniques et éperon nymphal constitué de 6 à 8 épines fusionnées.

Adulte : Couleur de base verdâtre pâle à brun clair. Aile de 5,8 mm de longueur à nervures antérieures brunes, longues, la nervure radio-médiane étant de couleur plus foncée et les veines postérieures de couleur pâle. Ratio antennaire de 3,8. Ratio basitarso-tibial de 1,2, les pattes étant brun pâle à la base et brun à l'apex. Corps très robuste. Bande bien visible sur le mésoscutum ; abdomen de couleur foncée. Tubercules frontaux coniques, de taille moyenne ; clypéus plutôt petit ; partie médiane du pronotum plutôt fortement élargie et de longueur exagérée. Tarse antérieur sans barbule, mais recouvert de poils exceptionnellement courts. Genitalia du mâle (terminalia) distinctifs (fig. F.2f), très développés et massifs. Femelle reconnue par sa couleur de même que par la partie médiane du pronotum, élongée de façon très exagérée.

Annexe G

Systématique générale de *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) [54]

Taxonomie et rapports phylogénétiques

Chironomus riparius est un chironomidé non piqueur (ordre Diptera ou vraies mouches) à deux stades larvaires aquatiques et un stade de courte durée à l'état d'adulte terrestre. L'espèce appartient à la famille Chironomidae (= Tendipedidae), sous-famille Chironominae, tribu Chironomini et sous-genre *Chironomus*. *Chironomus riparius* s'est révélé synonyme de *Chironomus thummi* Kieffer (Credland, 1973).

Les figures F.1 et F.2 de l'annexe F montrent la morphologie générale des larves et de l'adulte de *Chironomus* spp., y compris de *C. riparius*. La figure G.1 montre les caractéristiques taxonomiques de la larve et de l'adulte de *C. riparius*.

Répartition

C. riparius est une espèce holarctique. En Amérique du Nord, on l'a observé au Canada (Alberta, Saskatchewan, Manitoba, Ontario, Québec, Terre-Neuve et Territoires du Nord-Ouest) ainsi qu'aux États-Unis (Massachusetts, New Hampshire, Rhode Island, New Jersey, New York, Illinois, Ohio, Pennsylvanie, Michigan, Minnesota, district de Columbia, Maryland, Caroline du Nord, Caroline du Sud, Indiana, Iowa, Kansas, Virginie, Missouri, Nevada, Colorado et Alaska) [Townes, 1945 ; Curry, 1962 ; Rasmussen, 1984]. L'espèce est également largement répandue en Europe et elle est fréquemment observée en Autriche, en Belgique, en France, en Grande-Bretagne, en Allemagne, en Italie et en Scandinavie (Townes, 1945 ; Curry, 1962 ; Credland, 1973). Townes (1945) signale également l'espèce en Argentine.

Écologie

Les larves tubicoles de *C. riparius* habitent fréquemment les lacs, les étangs et les cours d'eau eutrophes ; ils vivraient dans des habitats littoraux à fonds boueux jusqu'à la profondeur de 1 m (Rasmussen, 1984 ; ASTM, 1995a). D'après Curry (1962), les larves construisent de longues galeries ou tubes dans la boue molle, et on les a recueillies dans le marl particulaire, la tourbe fibreuse, les vestiges végétaux et les détritus, à des profondeurs pouvant atteindre de 3 à 6 m. Principalement limivores, ils étendent souvent leurs extrémités antérieures à l'extérieur des tubes pour se nourrir de la couche superficielle du sédiment (Rasmussen, 1984 ; ASTM, 1995a). À l'instar de *C. tentans*, l'espèce s'est révélée tolérante à l'eutrophisation. Elle est donc considérée comme un indicateur ubiquiste de la pollution organique (Townes, 1945 ; Gower et Buckland, 1978). *C. riparius* semble posséder une grande tolérance à la granulométrie des sédiments et

---

54. Texte préparé par P. Hamr, Direction de la recherche sur les cours d'eau de l'Institut national de recherche sur les eaux, Environnement Canada, Centre canadien des eaux intérieures, Burlington (Ont.).

l'espèce a été observée dans la nature à des température variant de 0 à 33 °C, au pH de 5 à 9 et à des concentrations d'oxygène dissous d'à peine 1 mg/L (ASTM, 1991a, 1995a).

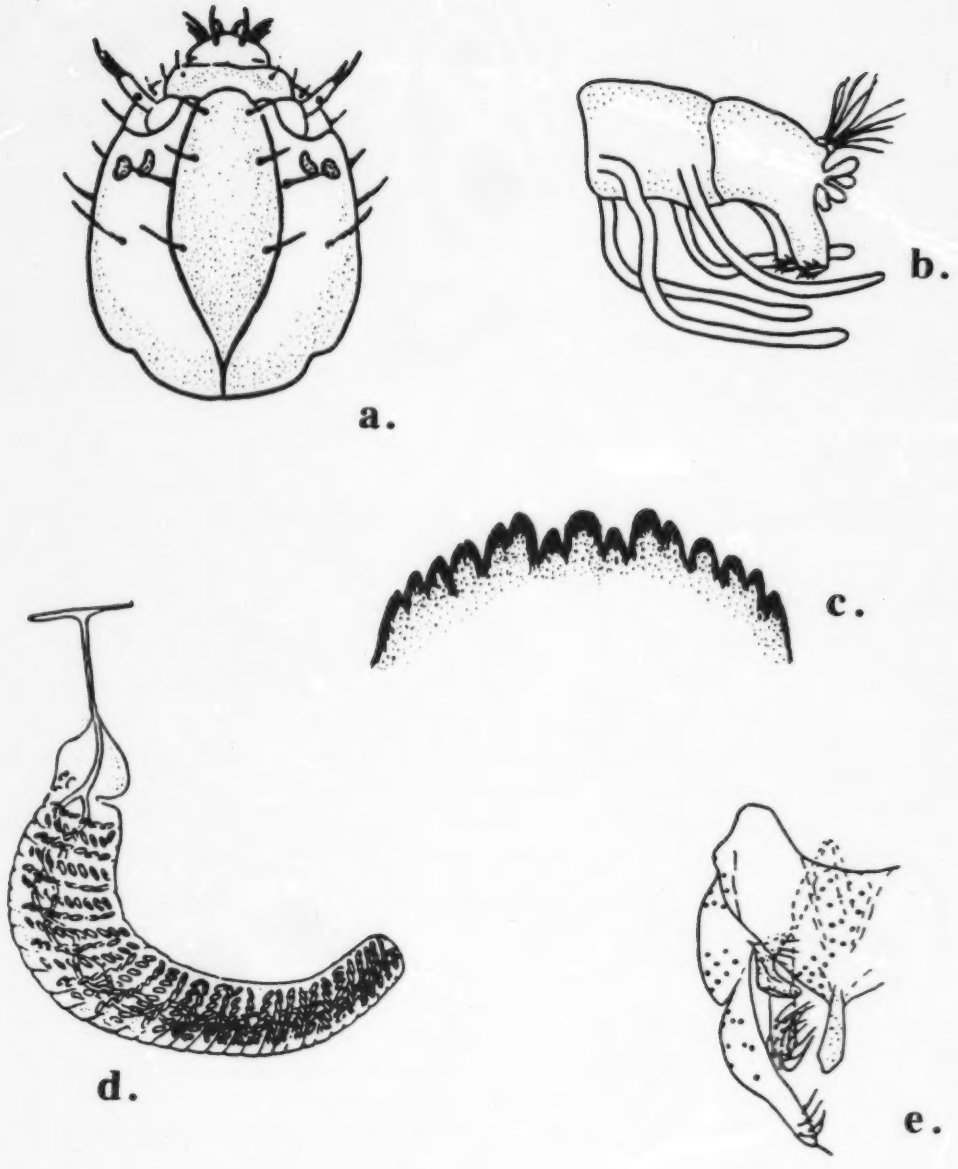
Cycle biologique et comportement reproducteur

Le cycle biologique de *C. riparius* comporte quatre étapes : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (imago). La larve et la nymphe sont aquatiques. L'adulte s'observe l'été durant, mais il est le plus abondant au début du printemps (Townes, 1945 ; Curry, 1962). On peut distinguer les mâles des femelles grâce à leurs grandes antennes plumeuses, à leur abdomen mince, à leurs genitalia visibles sur les segments terminaux de l'abdomen. Le comportement reproducteur de *C. riparius* est semblable à celui de *C. tentans*. L'accouplement a lieu en vol, dans l'essaim, et, après une journée ou deux, la femelle pond une masse d'œufs gélatineuse en forme de C (RIZA, 1993) [fig. G.1d]. La masse d'œufs en renferme 150 à 600, qui écloront après deux à six jours, selon la température de l'eau (Curry, 1962 ; ASTM, 1991a et 1995a ; RIZA, 1993).

Chaque stade larvaire dure de quatre à sept jours, la largeur de la capsule céphalique de nombreux stades larvaires est comme suit : premier stade, 0,07 à 0,12 mm ; deuxième stade, 0,13 à 0,24 mm ; troisième stade, 0,26 à 0,40 mm ; quatrième stade, 0,43 à 0,60 mm (RIZA, 1993 ; Day *et al.*, 1994). La croissance semble la plus forte au quatrième stade larvaire (Rasmussen, 1984), dont la livrée est rouge sang, alors que la tête est brun jaunâtre et les ocelles noires (Curry, 1962). Le dimorphisme sexuel se manifeste au quatrième stade, la larve mâle pesant en moyenne 29,4 % de moins que la larve femelle (Day *et al.*, 1994).

Après le quatrième stade, la larve se transforme en nymphe, et l'émergence survient immédiatement après que la nymphe gagne à la nage la surface de l'eau, les mâles sortant plus tôt (environ deux jours) que les femelles (RIZA, 1993). Les femelles adultes sont plus grosses que les mâles et elles portent une livrée plus foncées.

En moyenne, le cycle biologique de *C. riparius* dure de 15 à 30 jours, et on estime que les adultes des deux sexes vivent de 4 à 11 jours (Curry, 1962 ; RIZA, 1993 ; ASTM, 1995a). Dans les étangs de prairie de l'Alberta, l'espèce est univoltine (Rasmussen, 1984). Ce sont les larves du quatrième stade qui hivernent ; la nymphose, l'émergence et la ponte ont lieu principalement en mai. En Angleterre, l'espèce est polyvoltine, au moins cinq générations par année (Gower et Buckland, 1978). Le développement dépend de la température (28 j à 18 °C et 49 j à 12 °C), et tous les stades du cycle biologique peuvent coexister durant l'été et l'automne.



LARVE *a*) capsule céphalique, vue dorsale ; *b*) segments caudaux ; *c*) menton ; *d*) masse d'œufs.
ADULTE *e*) genitalia du mâle.

Figure G.1. — *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) [d'après Townes, 1945 et Usinger, 1963]

Chironomus riparius (Meigen, 1804)

Figure G.1. — Diagnose (d'après Johannsen, 1937b ; Townes, 1945 ; Curry, 1962 et Coffman, 1984)

Larve : De 16 mm de longueur, comprenant trois parties : tête, sclérotinée, thorax (3 segments) et abdomen (9 segments). Deux paires de branchies ventrales sur le onzième segment, mais aucun processus latéral à l'aspect de branchie sur le dixième (fig. G.1b). Papilles anales (procerques) possédant un pénicille de 6 poils. Antenne de 0,18 mm de longueur, dont la lame va de la base du deuxième segment jusqu'au milieu du cinquième. Organe annulaire dans le quart basal du premier segment. Mandibule dotée d'un peigne préapical, d'une brosse composée, à trois embranchements principaux et de deux soies près de la marge convexe. Trois dents latérales mandibulaires et une dent apicale noire ; la dent latérale la plus interne n'étant pas aussi foncée que les deux autres. Plaque labiale à 13 dents lobées, de couleur foncée ; dent médiane trilobée, ayant souvent l'apparence de trois dents distinctes et plus large que haute. Les premières dents latérales plus hautes que la dent médiane et très rapprochées des deuxièmes dents latérales. Plaques paralabiales près de trois fois plus larges que longues. Plaque épipharyngienne armée de 14 dents uniformes, pointues, longues.

Nymphe : 10 mm de longueur, jaune brunâtre ; marge des ébauches alaires, appendices thoraciques, marges latérales des segments abdominaux et appendices apicaux noircis. Tubercules céphaliques aigus, avec vibrisses préapicales. Notum thoracique noduleux, tergites abdominaux dotés des épines et des spinules habituelles. Organe respiratoire thoracique doté de nombreux filaments blancs. Éperon du segment 8 consistant en trois ou quatre épines fusionnées. Segments 5 à 7 comptant quatre filaments plats chacun ; segment 8 avec cinq filaments. Lobe caudal brun foncé, dont la marge compte plus de 100 filaments.

Adulte : Couleur de fond brun pâle à brun foncé, avec marques thoraciques brun rouge à brun noirâtre. Aile de 3,7 mm de longueur, nervures antérieure brunes, nervule transverse d'une couleur quelque peu plus foncée, nervures postérieures non pigmentées. Ratio antennaire de 3,3. Ratio basitarso-tibial de 1,6 ; pattes vert pâle à brun clair, vers la base et l'apex. Tarse antérieur sans barbe. Abdomen brun à noirâtre, partie apicale des tergites pruineux et de couleur pâle. Femelle de couleur semblable à celle du mâle. Genitalia du mâle (terminalia) distinctifs, avec appendice supérieur court et large et point anal étroit (fig. G.1e).

C. riparius coexiste avec d'autres chironomidés, y compris *C. decorus*, *C. plumosus*, *C. tentans*, *C. staegeri* et *Glyptotendipes paripes* (Curry, 1962 ; Rasmussen, 1984).

Annexe H

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques[55]

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)[56]

1	2	3	4	5	6	7
10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
3,2	4,6	5,6	6,3	6,8	7,2	7,5
1,00	2,2	3,2	4,0	4,6	5,2	5,6
0,32	1,00	1,8	2,5	3,2	3,7	4,2
0,10	0,46	1,00	1,6	2,2	2,7	3,2
	0,22	0,56	1,00	1,5	1,9	2,4
	0,10	0,32	0,63	1,00	1,4	1,8
		0,18	0,40	0,68	1,00	1,3
		0,10	0,25	0,46	0,72	1,00
			0,16	0,32	0,52	0,75
			0,10	0,22	0,37	0,56
				0,15	0,27	0,42
				0,10	0,19	0,32
					0,14	0,24
					0,10	0,18
						0,13
						0,10

55. Modifié d'après Rochinni *et al.* (1982).

56. Dans une colonne, on devrait choisir une série de cinq (au moins) concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage en poids (p. ex. mg/kg) ou en masse volumique (p. ex. mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par toute puissance de 10. On pourrait utiliser la première colonne si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser les concentrations plus largement espacées, puisqu'elles procureront une faible résolution des limites de confiance entourant toute valeur calculée à effet de seuil.